

博士論文

蛍光特性を有する次世代ケージド化合物の
合成と応用に関する研究

佐々木 康雄

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

2015年9月

目次

序論

第一章 光解離性保護基とケージド化合物

第一節	光解離性保護基	1
第二節	代表的な光解離性保護基	3
第三節	ケージド化合物	6
第四節	ケージド化合物の報告	8
第五節	チオクロモン型光解離性保護基	13
第六節	参考文献	16

第二章 チオクロモン型光解離性保護基のケージド化合物への適応性検証

第一節	ターゲット分子の選定	18
第二節	既報のケージド <i>D</i> -ルシフェリン	20
第三節	ケージドシクロヘキサンカルボン酸の合成	23
第四節	ケージドシクロヘキサンカルボン酸の光照射脱保護検討	
第一項	有機溶媒中のケージドシクロヘキサンカルボン酸の脱保護評価	24
第二項	水溶液中のケージドシクロヘキサンカルボン酸の脱保護評価	26
第五節	新規ケージド <i>D</i> -ルシフェリンの合成と <i>in vitro</i> 脱保護評価	
第一項	新規ケージド <i>D</i> -ルシフェリンの合成	30
第二項	ATP 濃度の予備検討	31
第三項	ルシフェリン濃度の測定レンジに関する予備検討	32
第四項	ケージドルシフェリンの <i>in vitro</i> 脱保護評価	33
第五項	ケージドルシフェリンの細胞内脱保護評価	35
第六節	小括	38
第七節	実験項	39
第八節	参考文献	44

第三章 新規ケージド核酸の開発

第一節	ターゲット分子の選定	45
第二節	新規ケージドチミジンの合成と脱保護評価	
第一項	チミジンへのチオクロモン型光解離性保護基の導入方法の考察	47
第二項	<i>O</i> -4 部位ケージドアセチル化チミジンの合成	48
第三項	<i>O</i> -4 部位ケージドアセチル化チミジンの光照射脱保護検討	50
第四項	新規蛍光性分子種の単離と構造推定	53
第三節	新規ケージドアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) への展開	
第一項	機能性 ASO の選定	70
第二項	オリゴ核酸合成へ向けた分子変換：ホスホロアミダイト体合成	73

第三項	ASO へのケージドチミジン導入検討77
第四節	新規ケージド ASO の機能評価	
第一項	<i>in vitro</i> 評価系の構築78
第二項	新規ケージド ASO の <i>in vitro</i> 脱保護評価83
第五節	小括92
第六節	実験項94
第七節	参考文献104
第四章	総括	
第五章	今後の展望	
業績一覧	110
謝辞	112

略語表

AMP	Adenosine monophosphate
ATP	Adenosine triphosphate
Bhc	(6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
DIPC	Diisopropylcarbodiimide
DMAP	<i>N,N</i> -Dimethyl-4-aminopyridine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamide
DMNPE	1-(4,5-Dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	2-({2-[Bis(carboxymethyl)amino]ethyl}(carboxymethyl)amino)acetic acid
Et	Ethyl
FBS	Fetal Bovine Serum
HOBt	1-Hydroxybenzotriazole
HRMS	High-resolution mass spectroscopy
<i>i</i> Pr	Isopropyl
IR	Infrared spectroscopy
<i>m</i> -CPBA	... <i>m</i> -	Chloroperoxybenzoic acid
Me	Methyl
MS	Mass spectrometry
NB	<i>o</i> -Nitrobenzyl
NPE	<i>o</i> -Nitrophenylethyl
Nu	Nucleophile
Ph	Phenyl
PLPG	Photolabile protecting group
P/S	Penicillin-streptomycin
RNA	Ribonucleic acid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Tetramethylsilane
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ts	<i>p</i> -Toluenesulfonyl
UV-Vis	Ultraviolet-visible absorption spectroscopy

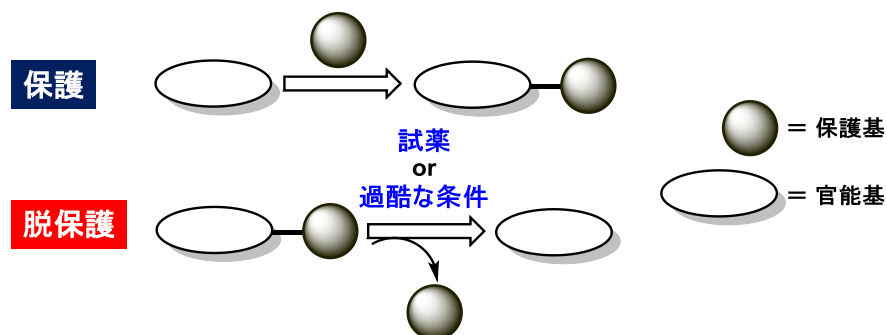
序論

第一章 光解離性保護基とケージド化合物

第一節 光解離性保護基

有機合成化学の分野において、複雑な構造を有する分子を合成する際には、余計な副反応の進行を抑制するために、分子内の反応性官能基を保護する必要性が生じる。これに続く脱保護ステップでは、更なる試薬の追加を必要とするのみならず、酸性、塩基性、還元的、酸化的あるいは求核的条件等の過酷な環境に曝す必要性が生じる。この場合、新たに追加した試薬による副生成物の生成や、過酷な環境に曝すことによる基質の分解や副反応の進行といった問題が懸念される。このような背景から、選択的に脱保護反応のみが進行する反応条件が求められてきた¹。ここで「光」を試薬として捉えると、光と反応する官能基はごく一握りであること、ならびに波長選択的な反応が可能であることから、「光」は脱保護試薬としての高い有用性を備えており、光照射のみで除去可能な保護基が利用可能となれば、多くの合成化学的問題が解決されることが期待できる。このような背景から、温和な条件下で脱保護させることができる「光解離性保護基(PLPG: 略号表参照)」が、現在までに盛んに研究されている²。

a)



b)

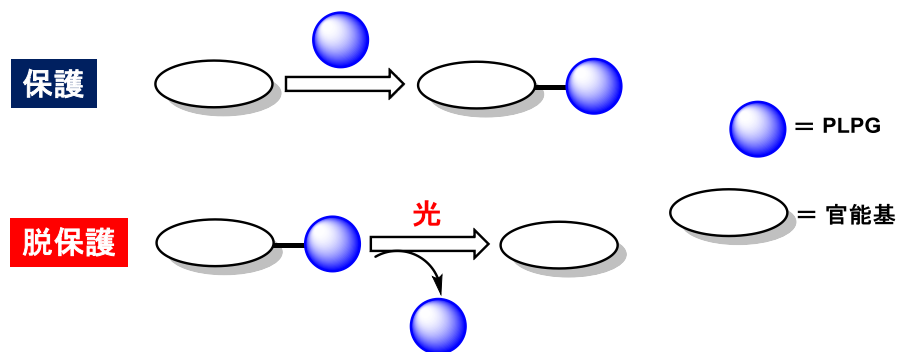


Figure 1. 保護基の概念：a)一般的な保護基；b)光解離性保護基（PLPG）

この光解離性保護基を活用することで、新たに試薬を加えることなく、常温、常圧かつ中性条件という、クリーンで温和な環境下での脱保護が可能となる。さらに、このような特性を活かし、有機合成化学分野のみならず、生物学分野におけるバイオプローブとしての活用も期待されている(Figure 1)。

第二節 代表的な光解離性保護基

現在までに、様々な光解離性保護基に関する報告が成されているが、その多くは以下の5種類に大別することができる(Figure 2)。

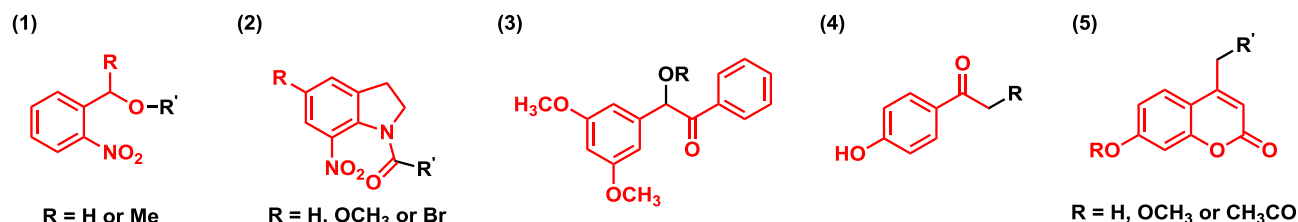


Figure 2. (1) 2-Nitrobenzyl 型 PLPG, (2) 7-Nitroindoline 型 PLPG, (3) Benzoin 型 PLPG, (4) *p*-Hydroxyphenacyl 型 PLPG, (5) Coumarin-4-ylmethyl 型 PLPG

(1) 2-Nitrobenzyl (NB)型 PLPG

2-Nitrobenzyl (NB)型 PLPG は、最も歴史が古く、また現在でも汎用的に利用されている光解離性保護基の1つである。その発見のルーツは 2-nitrobenzaldehyde の光異性化反応として Ciamician と Silber により報告された 1901 年にまで遡る³。1970 年に Woodward らによって光解離性保護基としての利用法が見出されて以来⁴、様々な用途に利用され、数多くの報告が成されている。現在までに、特に汎用性の高い 2-Nitrobenzyl 系保護基として 2-Nitrobenzyl 基の 4,5-dimethoxy 類縁体である DMNB⁵、1-(2-nitrophenyl)ethyl (NPE)³ 及びその 4,5-dimethoxy 類縁体の DMNPE⁶、さらには α -carboxy-2-nitrobenzyl (CNB)⁷ が報告されている。

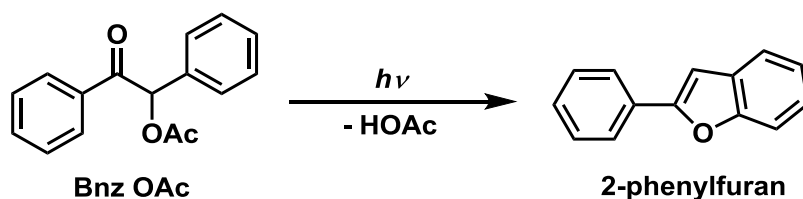
NB 系の光解離性保護基は、官能基適応性が広く、アルコール、アミン、カルボン酸、リン酸およびチオールを効率的に保護、脱保護することが可能であり、光脱保護機構も詳細に解明されている。一方で、NB 基の吸収極大はおよそ 260 nm にあるため、350 nm よりも長波長の光による光反応効率が低い点や、光脱保護反応後に副生するニトロソ化合物の反応性が高いことから、副反応を引き起こす懸念があることに加え、毒性も高いといった欠点が明らかとなっている⁸。

(2) 7-Nitroindoline (NI)型 PLPG

NB 基に次いで歴史が古く、Patchornik らが 1976 年に報告した 1-acyl-7-nitroindoline 類縁体の光解離に関する報告がルーツとなっている⁹。NB 基と同様、汎用的に利用されている保護基であるが、NI 基についても NB 基と同様の欠点が明らかとなっている。

(3) Benzoin (Bnz)型 PLPG

NB 型 PLPG よりも近紫外領域において高い UV 吸収を有する点、及び Bnz 基の導入が容易である点から、NB 基に代わる魅力的な光解離性保護基の一つとして位置づけられている。Sheehan らの Benzoin acetate に対する光解離に関する研究が、Bnz 型 PLPG のルーツと考えられている (Scheme 1)^{10,11}。

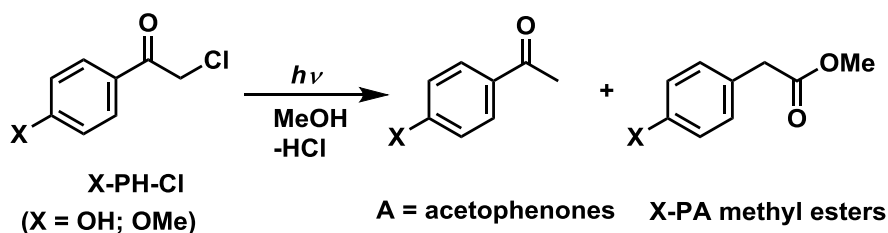


Scheme 1. Benzoin acetate の光解離反応

Bnz 型 PLPG は上記に述べたように種々のメリットがある一方で、分子内に立体中心を有する点、及び難水溶性といった欠点を有している点から、その応用範囲が限られている。

(4) *p*-Hydroxyphenacyl (*p*HP)型 PLPG

比較的最近報告された光解離性保護基ではあるが、合成が容易で、水への溶解性が高く、光反応後の副生成物に反応性の高い官能基を含まないといった優れた特徴を有している。*p*HP 基自体の歴史は古く、1962 年に Anderson らによって報告された *p*-methoxy 及び *p*-hydroxy phenyl chloride の methyl phenylacetate への光転位に関する報告がそのルーツとされている (Scheme 2)¹²。



Scheme 2. *p*-methoxy 及び *p*-hydroxy phenacyl chlorides の光反応.

また、1973 年に Sheehan らによって *p*HP 基の光解離性保護基としての可能性が示唆されているが、この報告では *p*HP 基を光解離性保護基へ利用可能であることを実証するには至っていない¹³。*p*HP 基は様々なメリットを有する一方で、可視光照射による脱保護が不可能といった欠点が明らかとなっている。

(5) Coumarin-4-ylmethyl 型 PLPG

1984年のGivensらによる(coumarin-4-yl)methanolリン酸エステルの光感受性に関する報告がルーツとなっている¹⁴。現在までに種々のCoumarin誘導体が報告されているが¹⁵、古田らによって開発された(6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methyl基(Bhc基)は、前出のNB基、NI基、*p*HP基が抱えていた課題を克服した高性能な光解離性保護基である (Figure 3)¹⁵。

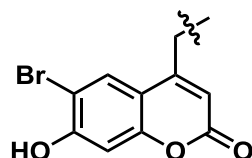


Figure 3. Bhc 基の構造.

Bhc基は①350 nmより長波長に吸収極大を有しているため可視光照射による脱保護が可能、②1光子および2光子励起による光反応効率が高い、③光反応後の副生成物に反応性の高い官能基を含まない、といった特徴を有しており、さらにはNB基と同様に幅広い官能基適応性を有している。このようなメリットから、有機合成化学分野のみならず、生命科学分野への汎用性が高く、現在までに数多くの応用例が報告されている。現時点では、最も優れた光解離性保護基の1つと考えられている。

従来、これらの光解離性保護基は主に有機合成化学の分野で活用されてきたが、近年では*p*HP基やBhc基といった、より生命科学分野への利用に適した保護基が開発されてきた。そのため現在では、これら光解離性保護基を有機合成化学へ利用するだけでなく、生命現象を解明するためのツールとして活用する研究に注目が集まっている¹⁶。

第三節 ケージド化合物

ケージド化合物とは、アミノ酸などの生理活性分子に光解離性保護基を導入することにより、一時的に不活性化させた化合物のことを指す。ケージド化合物に光を照射することで、光解離性保護基が除去され、元の生理活性分子が瞬時に放出される。つまり、ケージド化合物と光照射を組み合わせることで、従来の技術では困難であった生理活性の時空間的制御が可能となる (Figure 4)¹⁶。

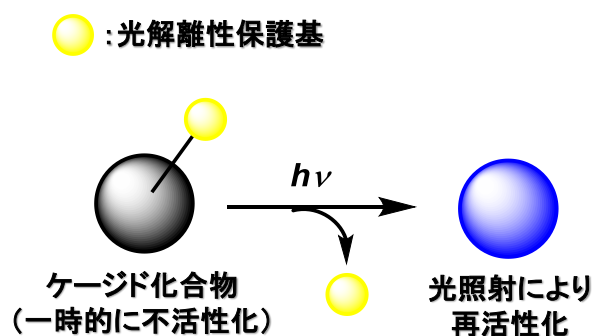


Figure 4. ケージド化合物の概念

このケージド化合物を利用することで、従来の実験手法では困難であった細胞内シグナル伝達の時空間的制御が可能となる (Figure 5)。

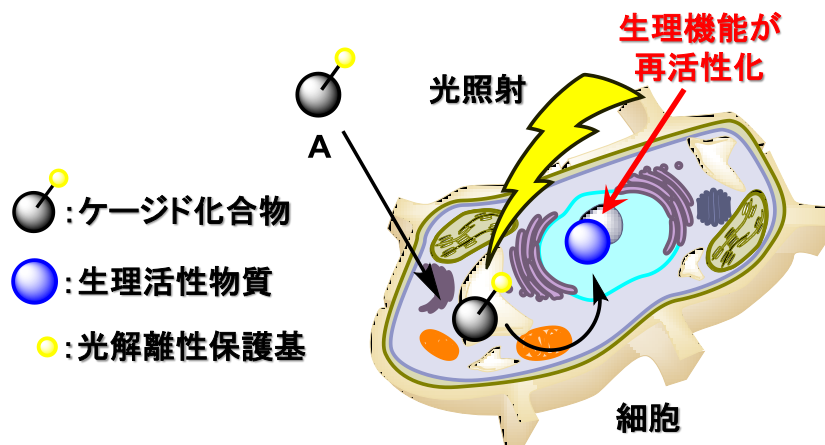


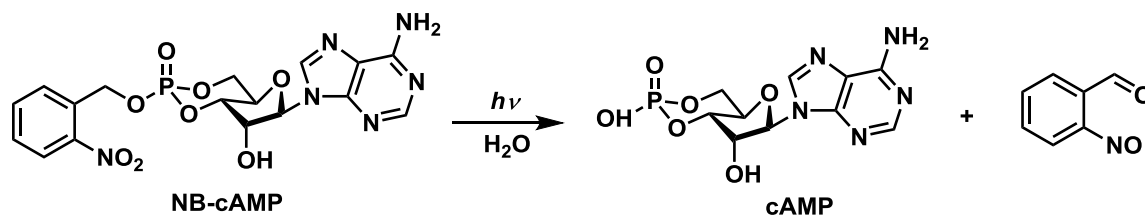
Figure 5. バイオプローブとしてのケージド化合物

例えば、生理活性に必要な官能基に対して光解離性保護基を導入した化合物 **A** (Figure 5) を細胞内に導入した場合を考えてみる。この化合物は、そのままでは生理活性を示さないが、細胞内へ導入後に光を照射すると、光解離性保護基が除去される。その結果、元の生理活性分子が再生され、従来のシグナル伝達分子としての機能を発揮するようになる。この技術を活用することで、細胞内においてシグナル伝達分子が機能する時間と場所を、光を照射するタイミングと位置で制御することが可能となる。さらに、原理的には照射する光の強度を制御することで、機能するシグナル伝達分子

の量さえも制御可能となる。以上のことから、ケージド化合物は生理活性分子に起因する生命現象をより詳細に解析するためのバイオプローブとして非常に有用である。

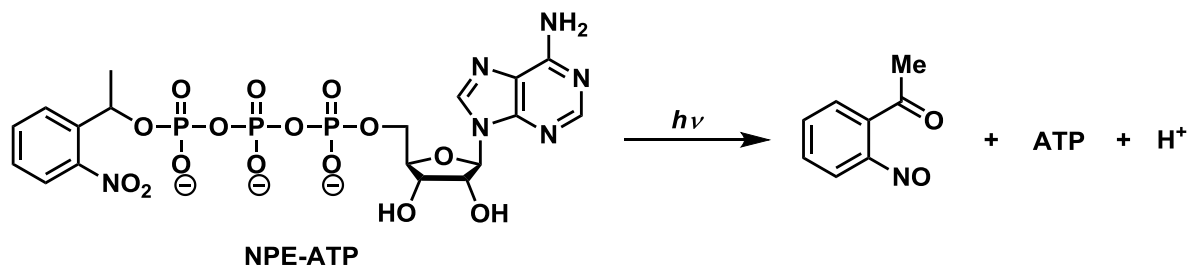
第四節 ケージド化合物の報告例

世界で初めて光解離性保護基をケージド化合物へと応用したのは、1977年のEngelsらの報告が最初である¹⁷。彼らはcAMPの環状リン酸部位をNB基で保護したNB-cAMPを合成し、NB-cAMPに対して紫外光を照射することにより光脱保護を達成している(Scheme 3)。このEngelsらによる報告は、それまで有機合成化学分野でのみ利用されていた光解離性保護基を初めて生物学研究へ応用した例として画期的なものである。



Scheme 3. NB-cAMPの光解離反応.

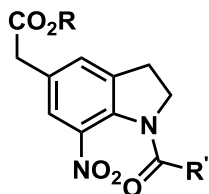
続いて1978年には、KaplanらがATPのリン酸部位をNPE基で保護したNPE-ATPを報告しており、こちらも紫外光を照射することで光脱保護を達成している(Scheme 4)¹⁸。



Scheme 4. NPE-ATPの光解離反応.

これらの報告を皮切りに、NB系の光解離性保護基を利用したケージド化合物の研究が加速することになった。

NI 基では 1999 年頃から *L*-グルタミン酸や GABA 及びグリシンといった神経活性を有するアミノ酸に対して NI 基を導入したケージドアミノ酸 (Figure 6)に関する研究結果が報告された¹⁹。その結果、これらのケージドアミノ酸がバイオプローブに応用可能である事が認知され、現在までに神経生理学研究の発展に寄与している。

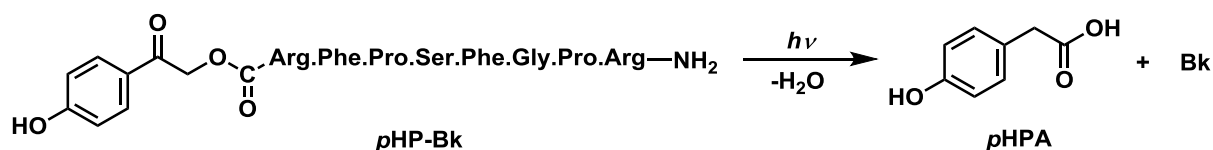


(1) R = Me, R' = (CH₂)₂CH(NH₃⁺)CO₂⁻

(2) R = Me, R' = (CH₂)₃NH₃⁺

Figure 6. (1) ケージド *L*-グルタミン酸、(2) ケージド GABA

*p*HP 基では、1996 年に Givens らによって、生理活性分子に *p*HP 基を導入した *p*HP-ATP が報告され²⁰、これが皮切りとなり後続の *p*HP-*L*-グルタミン酸、*p*HP-GABA 等のケージドアミノ酸の研究へと展開されている²¹。さらには短鎖の生理活性ペプチドである Bradykinin (Bk)へ導入した *p*HP-Bk も報告されており²²、その応用例はセカンドメッセンジャーにまで及んでいる (Scheme 5)。



Scheme 5. *p*HP-Bk の光反応.

これらケージド化合物に関する初期の検討では、無細胞系における検討が大多数を占めており、ケージド化合物の細胞内への応用は少数であった。その理由としては、ケージド化合物を細胞内検討へと応用するためには、①ケージド化合物が容易に水に溶けること、②保護基由来の細胞毒性が無いこと、③可視光による脱保護が可能であること、といった条件を乗り越える必要があり、NB 基、NI 基、及び *p*HP 基はこれらの条件を容易に満たすことができなかったためである。その後、光解離性保護基に関する研究が進み、これら一連の光解離性保護基の欠点 (可視光による脱保護不可能、副生する保護基由来化合物の細胞毒性、難水溶性) が改善された Bhc 基を初めとする Coumarin-4-ylmethyl 系の光解離性保護基が開発され、よりケージド化合物に適した光解離性保護基として利用されてきた。Bhc 基を利用したケージド化合物は細胞内への利用に適しているため、細胞内への応用例として多数の報告が成されている。その一例として、Bhc 基をメッセンジャーRNA (略語表参照; mRNA)へ導入することで、一時的に mRNA としての機能を抑制したケージド mRNA に関する報告をとりあげる。

2001年に古田らによって Bhc 基を利用したケージド mRNA に関する報告が成された²³。この報告では、古田らが開発した Bhc-diazo を緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein, GFP) mRNA と反応させることで、GFP mRNA のリン酸結合

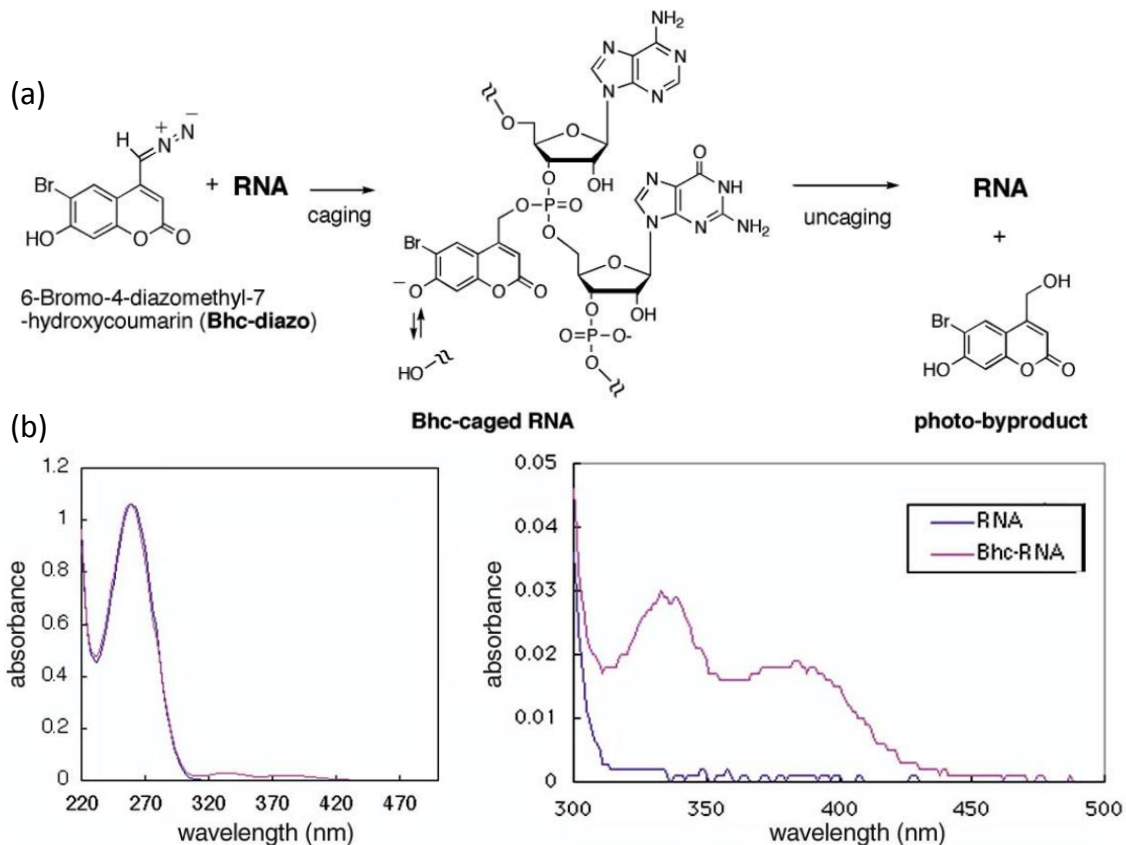


Figure 7. (a) RNA への Bhc 基の導入方法, (b) GFP mRNA 及び Bhc-RNA の UV-Vis スペクトル (参考文献 23 より引用)

部位へ Bhc 基を導入している。古田らの報告によれば、mRNA の 1 kb あたり約 30 ヶ所のリン酸部位へ Bhc 基が導入されるとのことである (Figure 7a)。UV-Vis スペクトルの結果、mRNA 自体は波長 310 nm 以上の領域において、ほぼ光吸収帯が認められないが、GFP mRNA に対して Bhc 基を導入した Bhc-RNA では、波長 310 nm ~ 450 nm の領域で明確な光吸収帯が認められるため、Bhc-RNA は波長 310 nm 以上の光を照射することにより脱保護が期待された (Figure 7b)。

続いて、Bhc-RNA をゼブラフィッシュの胚へ導入し、光照射有り無しそれぞれの条件下により元の GFP mRNA 機能を評価した。まず、通常の GFP mRNA を導入したゼブラフィッシュ胚では、mRNA が正常に機能することにより、その翻訳産物である GFP タンパク質が生成し、ゼブラフィッシュ胚から緑色蛍光が確認された (Figure 8b)。一方で、GFP mRNA に Bhc 基を導入した Bhc-RNA を胚へ導入した場合、ゼブラフィッシュ胚から緑色蛍光がほとんど確認されなかった。これは、GFP mRNA が正常に翻訳されなかったために、緑色蛍光を示さなかったと考えられる (Figure 8d)。続いて、Bhc-RNA を導入したゼブラフィッシュ胚のうち、365 nm の

光を 10 秒間照射した個体では、光照射していない個体に比べて緑色蛍光が確認される (Figure 8d, f)。さらに、365 nm の光を 20 秒間照射した個体では、より多くの緑色蛍光が確認できる (Figure 8h)。

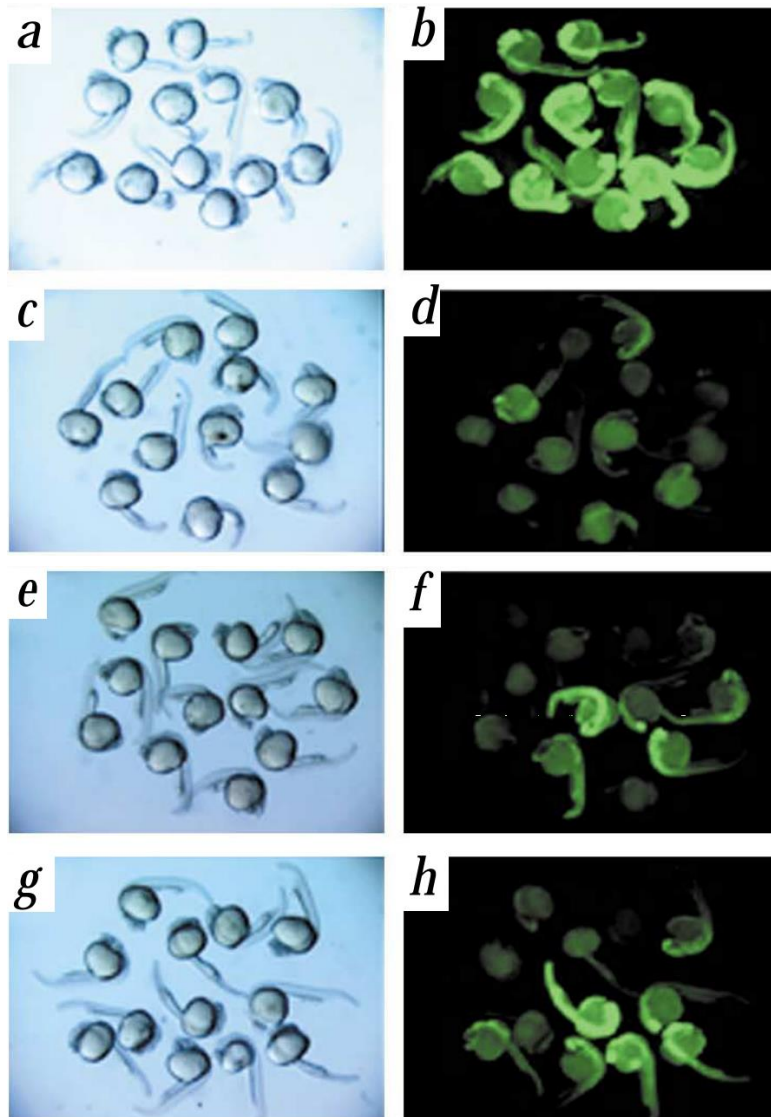


Figure 8. Bhc-RNA の細胞内光脱保護評価.

(a, b) GFP mRNA 導入個体 (c, d) 光照射無しの条件下での Bhc-RNA 導入個体
(e, f) Bhc-RNA 導入個体に対して 365 nm の光を 10 sec 照射した結果
(g, h) Bhc-RNA 導入個体に対して 365 nm の光を 20 sec 照射した結果
(参考文献 23 より引用)

これら Bhc-RNA を用いた一連の検討により、細胞内においても光脱保護反応が進行し、元の GFP mRNA 機能が復元することが明らかとなっている。以上のことから、数ある光解離性保護基のうち、Bhc 基及びその誘導体は、ケージド化合物への応用に適している保護基の代表格と考えられている。

以上のように、現在までに数多くのケージド化合物に関する報告が成されているが、これら従来のケージド化合物では、『生理機能の確認にバイオアッセイが必要』である点や、脱保護過程をリアルタイムに追跡できない、といった欠点が明らかとなっている。そのため、このような特性を有する次世代のケージド化合物の開発が望まれている。

第五節 所属研究室で開発された光解離性保護基

所属研究室では、新規な光解離性保護基としてチオクロモン型光解離性保護基が開発されてきた (Figure 9)。現在までにアルコール型 **1a**^{24a}、クロロホルメート型 **1b**^{24a}、ジアゾ型 **1c**^{24b}、ジオール型 **1d**^{24c} の四種が開発されており、カルボン酸、アルコール、アミン、リン酸、カルボニル化合物の保護、脱保護に利用可能であることを報告している。

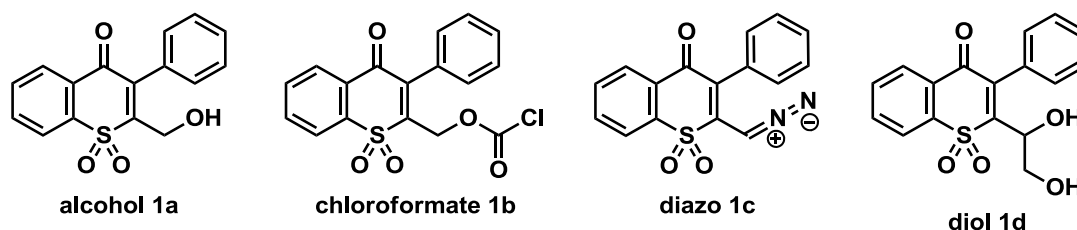
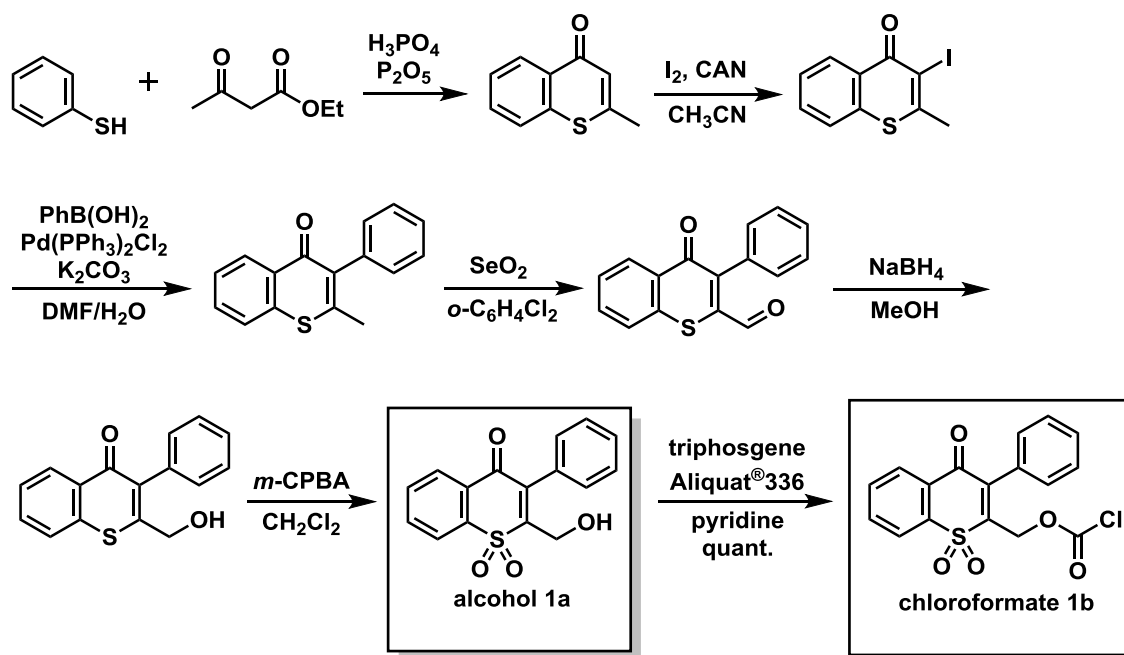


Figure 9.チオクロモン型光解離性保護基 1

特に汎用性の高い保護基 **1a** 及び **1b** を例に、その合成過程を Scheme 6 に示す^{24a}。

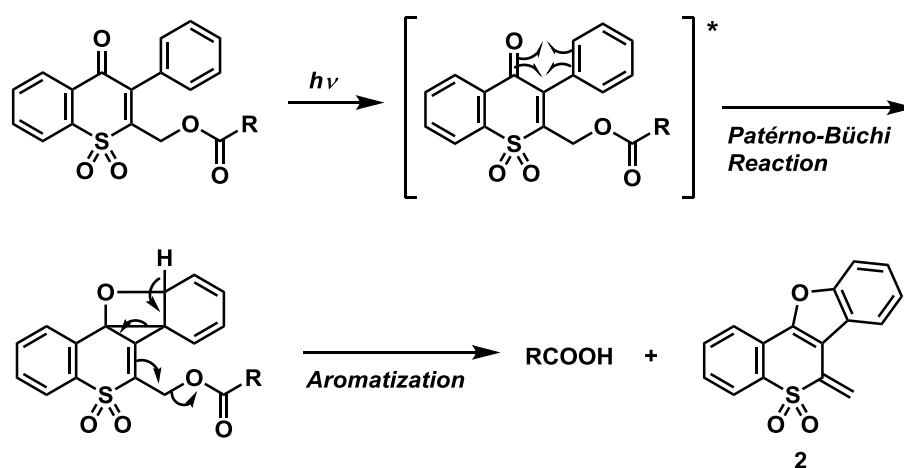


Scheme 6. 本光解離性保護基の合成経路：アルコール体 **1a** 及びクロロホルメート体 **1b**

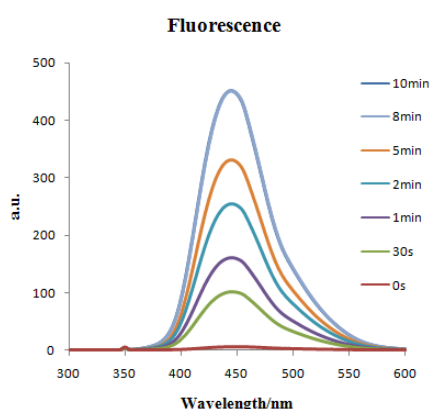
エステル結合を介してカルボン酸を保護した場合を例に、本保護基の推定脱保護機構を Figure 10 に示す。まず、光照射により励起状態を経た後、続いてエノンのカルボニルとフェニル基の二重結合が Patérno-Büchi 反応によりオキセタン骨格を構築する。次いで、芳香族化とオキセタン骨格の歪の解放を駆動力として環開裂が進行し、

新たな環骨格を構築した結果として 4 環性化合物 **2** が生成すると同時に、カルボン酸が放出される。本チオクロモン型光解離性保護基 **1** の最大の特徴は、光脱保護後に副生される四環性化合物 **2** が蛍光（メタノール中における最大蛍光波長：445 nm）を発する点にある（Figure 10(b)(c)、ただしジオール **1d** を除く）。**2** の蛍光量子収率(Φ)は 0.85 であり、蛍光物質として汎用的に利用されているフルオレセイン($\Phi=0.9$)に匹敵するため²⁵、蛍光プローブとして利用できる可能性を秘めている。さらに、前述の NB 基、NI 基、*p*HP 基、Bhc 基といった従来の光解離性保護基では、光脱保護反応後に生成する保護基由来の副生物が蛍光を発するといった特性が無いことから、従来の保護基では不可能であった蛍光を指標にした光脱保護反応の追跡が可能となる。さらには、本保護基 **1** をケージド化合物へ応用することにより、副生する四環性化合物 **2** の蛍光を測定するだけで、バイオアッセイを実施することなく生理活性の復元をリアルタイムに追跡できる画期的な手法の開発が期待できる。一方で、これまで本保護基 **1** をケージド化合物へ適応した実績は無い。特にケージド化合物として利用するためには、水溶液中での脱保護能が求められるものの、水溶液中での検討は皆無であっ

a)



b)



c)



Figure 10. a) カルボン酸を例にした本保護基の推定脱保護機構；b) 蛍光スペクトル測定による脱保護過程の追跡；c) 化合物 **2** の蛍光 ($\Phi=0.85$) (参考文献 24a より引用)

た。

以上の背景から著者は、まず本保護基がケージド化合物として利用可能なのか検証するため、*D*-ルシフェリンを題材とした本保護基 **1** のケージド化合物への適応性検証 (第二章) に着手し、続いて蛍光特性を有する次世代ケージド化合物の開発 (第三章) に着手することとした。そして、光照射による生理機能の復元を可能にするだけでなく、従来のケージド化合物では不可能であった、蛍光測定による生理機能の復元確認が可能となるようなケージド化合物を目指した。本目的を達成することで、生理機能の復元をリアルタイムに追跡できるのみならず、生理活性分子の作用部位を正確に特定することが可能となり、より詳細に生命現象を解明することが可能となる。

第六節 参考文献

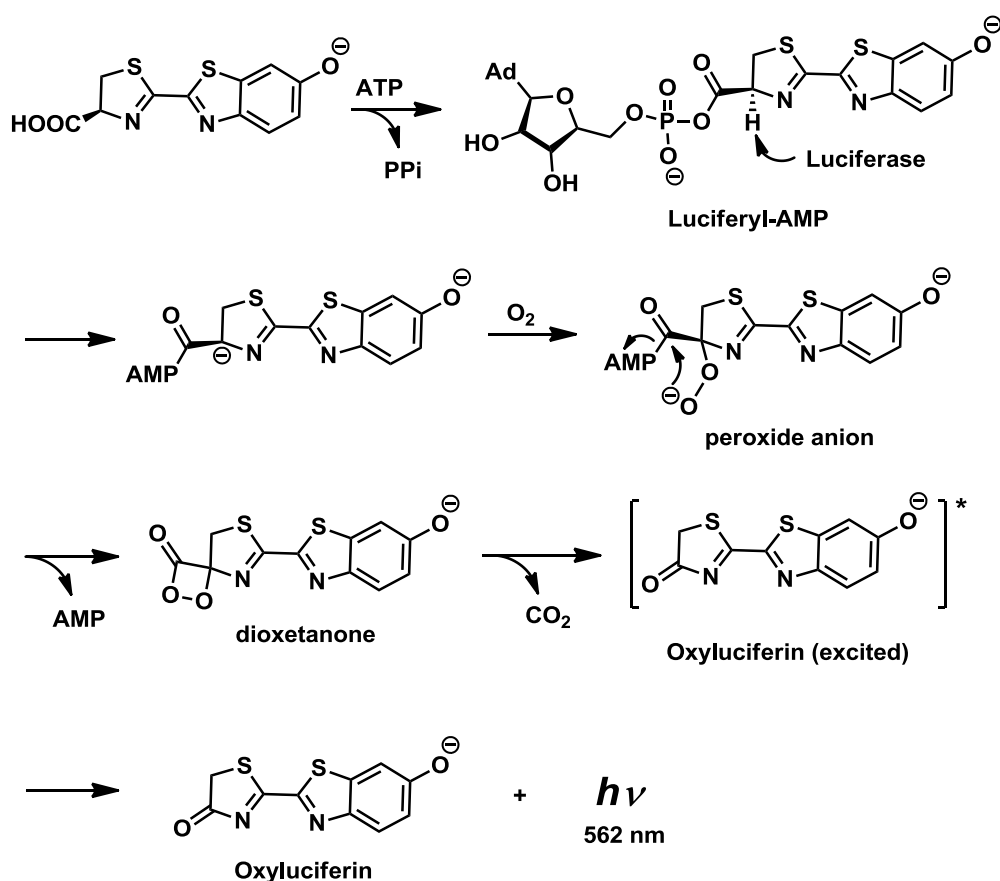
- 1) *Protective Groups in Organic Synthesis, 4th Edition*; P. G. M. Wuts; T. W. Greene, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2007**.
- 2) (a) R. W. Brinkley; T. W. Flenchtner, *Synthetic Organic Photochemistry*; W. M. Horspool, Ed.; Plenum: New York, **1984**, p 375–423. (b) C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2002**, *2*, 125. (c) C. G. Bochet; A. Blanc, *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology*; A. Griesbeck; M. Oelgemöller; F. Ghetti, Ed.; CRC: Boca Raton, **2012**, Vol. 1, p 73–93. (d) P. Klán; T. Šolomek; C. G. Bochet; A. Blanc; R. Givens; M. Rubina; V. Popik; A. Kostikov; J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- 3) G. Ciamician; P. Silber, *Chem. Ber.*, **1901**, *34*, 2040.
- 4) A. Patchornik; B. Amit; R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6333.
- 5) A. M. Gurney; H.A. Lester, *Physiol. Rev.*, **1987**, *67*, 583.
- 6) B. E. Cohen; B. L. Stoddard; D. E. Koshland, Jr., *Biochemistry*, **1997**, *36*, 9035..
- 7) J. E. T. Corrie; V. R. N. Munasinghe; D. R. Trentham; A. Barth, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, *7*, 84.
- 8) *Dynamic Studies in Biology*; M. Goeldner; R. Givens, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2005**.
- 9) B. Amit; D. A. Ben-Efraim; A. Patchornik, *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, *98*, 843.
- 10) J. C. Sheehan; R. M. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1964**, *86*, 5277.
- 11) J. C. Sheehan; R. M. Wilson; A. W. Oxford, *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 7222.
- 12) J. C. Anderson; C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.*, **1962**, *3*, 1.
- 13) J. C. Seehan; K. Umezawa, *J. Org. Chem.*, **1973**, *38*, 3771.
- 14) R. S. Givens; B. Matuszewski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, *106*, 6860.
- 15) A. Z. Suzuki; T. Watanabe; M. Kawamoto; K. Nishiyama; H. Yamashita; M. Iwamura; T. Furuta, *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 4867.
- 16) G. C. R. Ellis-Davies, *Nature Methods*, **2007**, *4*, 619.
- 17) J. Engels; E. J. Schlager, *J. Med. Chem.* **1977**, *20*, 907.
- 18) J. H. Kaplan; B. Forbush; J. F. Hoffman, *Biochemistry*, **1978**, *17*, 1929.
- 19) M. Canepari; L. Nelson; G. Papageorgiou; J. E. T. Corrie; D. Ogden, *J. Neurosci. Methods*, **2001**, *112*, 29.
- 20) R. S. Givens; C.-H. Park, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *35*, 6259.
- 21) R. S. Givens; A. Jung; C.-H. Park; J. Weber; W. J. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 8369.
- 22) R. S. Givens; J. F. W. Weber; P. G. Conrad II; G. Orosz; S. L. Donahue; S. A. Thayer, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2687.
- 23) H. Ando; T. Furuta; R. Y. Tsien; H. Okamoto, *Nature Genetics*, **2001**, *28*, 317.

- 24)(a) S. Kitani; K. Sugawara; K. Tsutsumi; T. Morimoto; K. Kakiuchi, *Chem. Commun.*, **2008**, 2103. (b) Y. Zhang; H. Tanimoto; Y. Nishiyama; T. Morimoto; K. Kakiuchi, *Synlett*, **2012**, *23*, 367. (c) R. Sugiura; R. Kozaki; S. Kitani; Y. Goshō; H. Tanimoto; Y. Nishiyama; T. Morimoto; K. Kakiuchi, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3984.
- 25) M. M. Martin; L. Lindqvist, *Journal of Luminescence*, **1975**, *10*, 381.

第二章 チオクロモン型光解離性保護基のケージド化合物への適応性検証

第一節 ターゲット分子の選定

現在までに、所属研究室では各種チオクロモン型光解離性保護基を開発してきたが、未だケージド化合物へ適応した実績は無い。今回著者は、数多くの生理活性分子の中から、ホタル由来の発光性基質である *D*-ルシフェリン（以下ルシフェリン）をターゲット分子に選択した。ルシフェリンは、ATP、マグネシウムイオン存在下で、ホタルルシフェラーゼ酵素の作用によりオキシルシフェリンに変換され、このオキシルシフェリンが黄緑色の化学発光を示す（最大発光波長 562 nm）ことが知られている (Scheme 7)¹。反応機構としては、まずルシフェリンのカルボキシル基が ATP の α 位のリン酸を攻撃し、ピロリン酸 (PPi) が放出される。次いで、ルシフェリル AMP 中間体が酸化されてペルオキシドアニオン種を生成する。ペルオキシドアニオン種はジオキセタン骨格を構築すると同時に AMP を放出する。続く脱炭酸により励起したオキシルシフェリンが生成され、これが基底状態へと失活する。この際、差分のエネルギーが黄緑色の可視光として放出される。



Scheme 7. ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応

本検討でルシフェリンを選定した理由は、ルシフェリンは①チオクロモン型光解離性保護基により保護可能な官能基（カルボキシル基及びヒドロキシル基）を有する、

②ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応産物であるオキシルシフェリンの発光量子収率が0.88と極めて高いため²、わずかな脱保護でも発光シグナルとして高感度に検出可能、③ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応は酵素反応である為、反応が進行する際には元のルシフェリンが完全な状態で再生している事が明白、④試験管内光脱保護評価のみならず、ホタルルシフェラーゼを安定発現した細胞を用いる事で、細胞内光脱保護評価も可能、といった優れた性質を有しているからである。なお本ケージドルシフェリンの検討では、チオクロモン型光解離性保護基の最大のメリットである、光照射後に副生する蛍光発光性化合物**2**の活用は考慮しておらず、本保護基**1**のケージド化合物への適用可能性を検証することを主な目的としている。

第二節 既報のケージドルシフェリン

現在までに、他の光解離性保護基が導入されたケージドルシフェリンとして、二つの報告例が存在している。最初の報告が、Thomason らによって報告された 1-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)ethyl 基 (DMNPE 基) を保護基として用いた DMNPE-ルシフェリンである³。DMNPE 基は NB 系の光解離性保護基の一種であり、365 nm の紫外光照射で速やかに脱保護されることが知られている。市販されていることから手に入りやすい保護基でもあり、現在でも生理活性物質のケージングに広く用いられている。Thomason らは DMNPE 基でルシフェリン分子内のカルボキシル基をエステル結合を介して導入することで DMNPE-ルシフェリンの合成に成功している。この DMNPE-ルシフェリンをルシフェラーゼ安定発現 L8 筋芽細胞に取り込ませた後、細胞外より光照射することにより、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応産物として生成するオキシルシフェリンによる発光を指標とした細胞内脱保護現象の観測に成功している (Figure 11)。

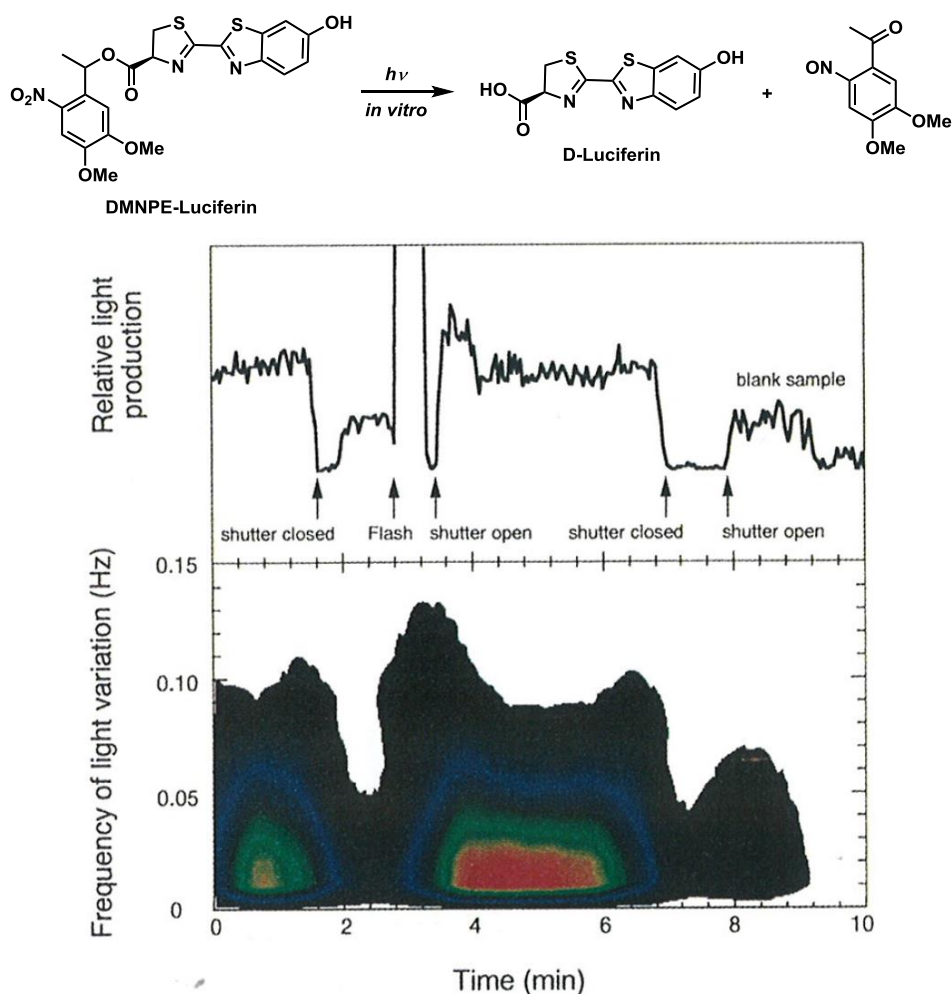


Figure 11. DMNPE-ルシフェリンを導入したルシフェラーゼ安定発現 L8 筋芽細胞への紫外光照射に伴う発光測定：上が相対光量；下が発光頻度（赤いほど高頻度）（参考文献 3 より引用）。

続く Xing らによる報告では、Nitrophenylethyl 基 (NPE 基) を保護基として導入した NPE-ルシフェリンの合成に成功している。この NPE 基も NB 系の光解離性保護基の一種であり、合成が容易のため生理活性物質のケージングに広く用いられている保護基の一つである。彼らはルシフェリン分子内のカルボキシル基ではなく、ヒドロキシル基を保護している点で、前述の DMNPE-ルシフェリンとは異なる戦略を用いている⁴。ケージド化合物の合成を計画する場合、ターゲット分子となる生理活性分子において、その生理活性発現に寄与する官能基に対して光解離性保護基を導入するのが一般的である。しかし、ルシフェリン分子のように、ルシフェラーゼ酵素の活性ポケットに鍵と鍵穴の関係として分子が填まる事が、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応開始の必要条件となる場合では、ルシフェリン分子に直接置換基を導入し、構造そのものを変化させることで、本来の機能を失活させる戦略が可能となる。つまり、今回の NPE-ルシフェリンでは NPE 基導入により意図的に構造を変化させることで、ルシフェリンの生理活性を一時的に不活性化させることに成功した例として、我々に重要な知見を与えている (Figure 12)。

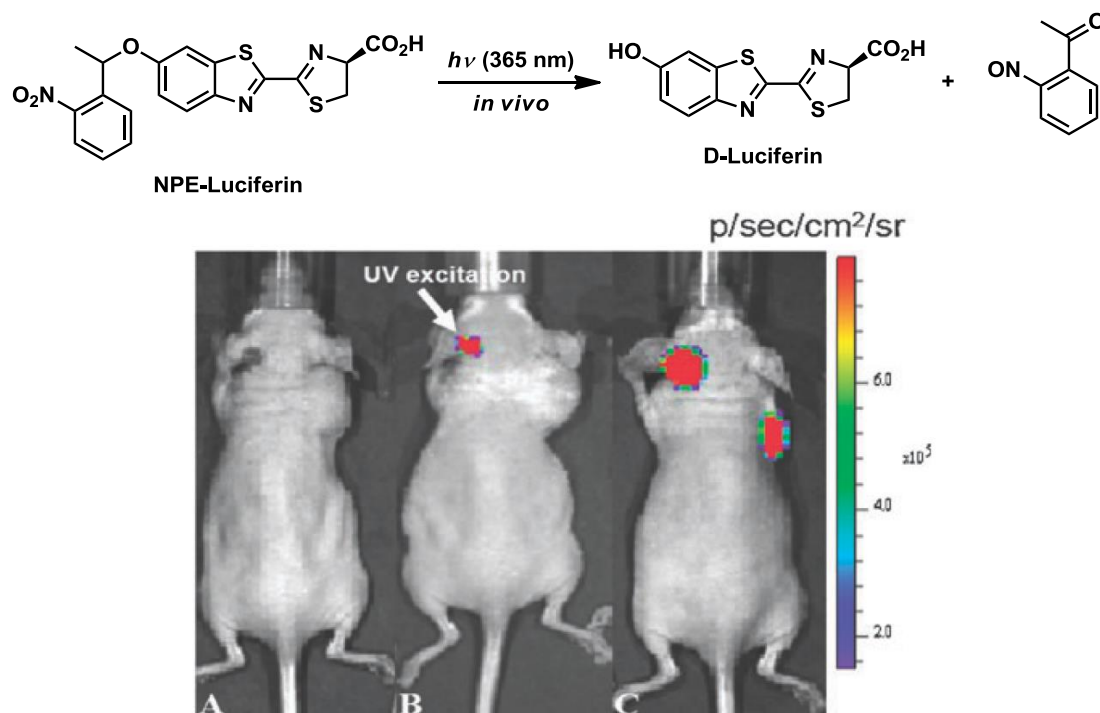


Figure 12. NPE ルシフェリンの生体内脱保護 (A, B, C ともにルシフェラーゼ発現グリオーマ C6 細胞を左耳及び右肩へ移植後 10 日経過している) : NPE-ルシフェリンを尾静脈より投与後 A) : UV 照射無し ; B) 左耳のみ UV 照射 ; C) ルシフェリンを尾静脈より投与後、UV 照射無し (参考文献 4 より引用)

Figure 12 では、ルシフェラーゼ発現グリオーマ C6 細胞を左耳及び右肩へ移植した担癌マウスに対して、NPE-ルシフェリンを尾静脈より投与している。投与後に、左耳のみに UV 照射を実施した担癌マウスでは、左耳のみでルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光が認められており、UV 照射していない右肩では発光が認めら

れていない (Figure 12B)。つまり、Xing らは NPE-ルシフェリンを尾静脈より投与し、局所的に UV 照射することで、生体内における光脱保護を達成しており、ケージドルシフェリンの生体内利用に関する知見を与えている。

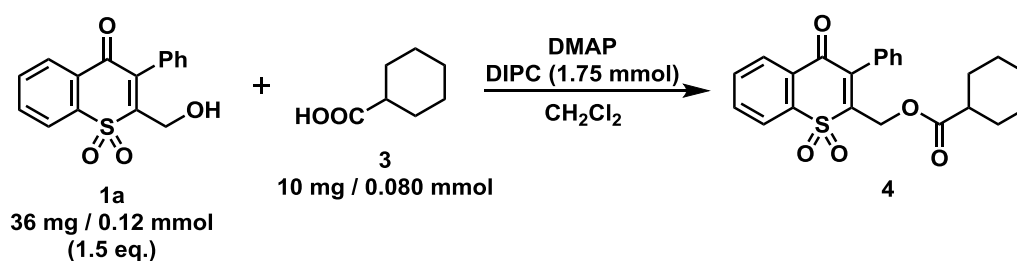
既報のケージドルシフェリンに関する知見を参考にすると、ルシフェリン分子内のカルボキシル基及びヒドロキシル基のどちらか片方に保護基を導入することで、その機能を不活化させることが可能と考えられる。ここで、我々のチオクロモン型光解離性保護基には、カルボキシル基の保護に利用できるアルコール型保護基 **1a** およびジアゾ型保護基 **1c**、ヒドロキシル基の保護に利用できるクロロホルメート型保護基 **1b** の三種類がある。そこで、今回著者はルシフェリン分子内のカルボキシル基への保護基導入を選択し、アルコール型保護基 **1a** を利用することにした。それは、保護基 **1a** が本保護基 **1** の中でも最も短工程で合成でき、なおかつ安定であるためその取扱いが容易であるためである。クロロホルメート型保護基 **1b** およびジアゾ型保護基 **1c** はいずれもアルコール型保護基 **1a** に比べると不安定であることから、次善の策とした。

第三節 ケージドシクロヘキサンカルボン酸の合成

ケージド *D*-ルシフェリン (以下、ケージドルシフェリン) の合成に先んじて、ルシフェリンのモデル分子としてシクロヘキサンカルボン酸 **3** を選択し、カルボキシル基の保護及び光照射脱保護検討を行うこととした。シクロヘキサンカルボン酸 **3** は非芳香環に二級のカルボキシル基が結合している点でルシフェリンと類似した構造を有していることから、モデル分子として最適であると判断した。シクロヘキサンカルボン酸の保護、脱保護条件を詳細に把握することで、続くケージドルシフェリンの検討をスムーズに実施することが可能であると考えた。

まず、先行文献に従いチオクロモン型保護基 **1a** を合成した⁵。続いて、保護基 **1a** を用いてカルボキシル基の保護を試みた (Table 1)。

Table 1. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の合成



Entry	DMAP (eq.)	Temp (°C)	Time (h)	Yield (mg / %)	1a recovered (mg)
1	1.75	rt	3	1.5 / 4.5 ^a	5.2
2	1.75	rt	1	7.0 / 21 ^a	8.0
3	0.40	rt	1	11.6 / 35 ^b	6.3
4	0.40	0	3.5	16.9 / 51 ^b	10.2

^a NMR yield. ^b Isolated yield.

保護基 **1a** を用いて、カルボジイミド法によりカルボキシル基の保護を検討したが、目的化合物はわずかししか得ることができなかった (entry 1)。TLC で反応を追跡したところ、反応時間が長くなるにつれ生成物 **4** のスポットが薄くなっていき、原点のスポットが濃くなっていくことが確認できた。このことから、生成物 **4** の分解が示唆されたため、反応時間を短縮したところ、収率が向上した (entry 2)。ここで、本来 DMAP の使用量は触媒量で必要十分と考えられたため、当量数を 1.75 から 0.40 当量まで減らしたところ、収率を向上させることができた (entry 3)。また、生成物 **4** の分解を抑えるため、反応温度を室温から 0 °C まで低下させたところ、さらに収率が向上し、最終的には収率 51% で目的とするケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** を得ることに成功した (entry 4)。

第四節 ケージドシクロヘキサンカルボン酸の光照射脱保護評価

第一項 有機溶媒中のケージドシクロヘキサンカルボン酸の脱保護評価

ケージドシクロヘキサンカルボン酸の光脱保護検討に先立ち、有機溶媒中における UV-Vis スペクトルを測定した (Figure 13)。

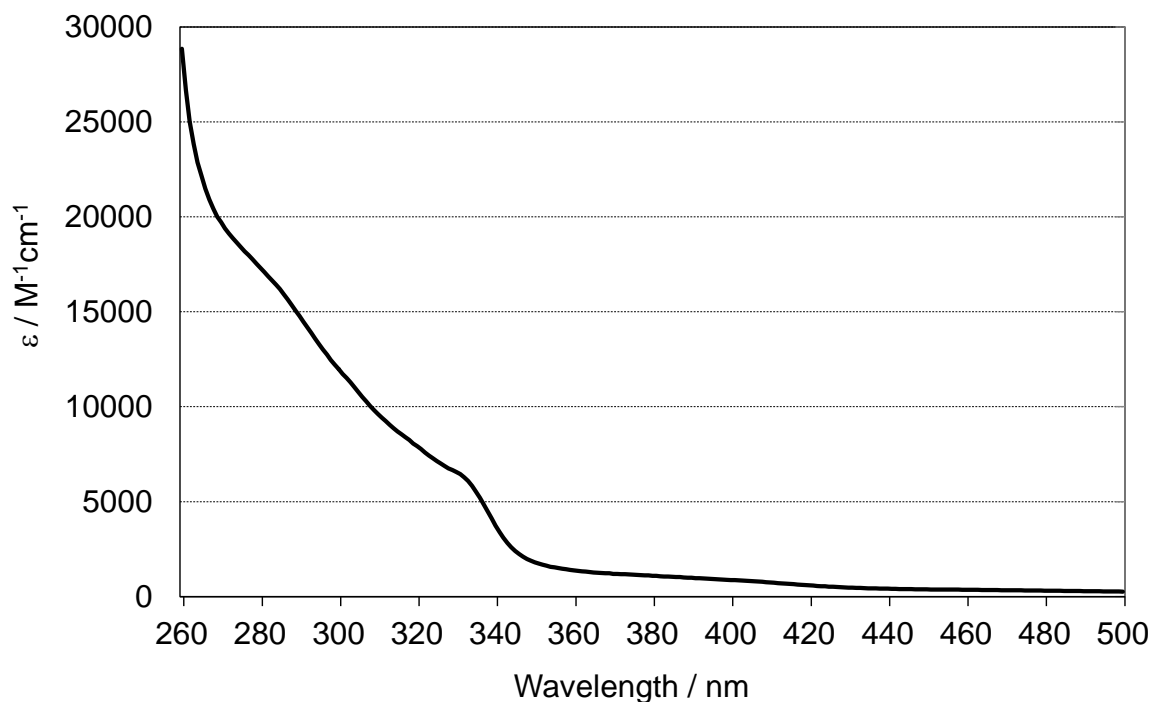


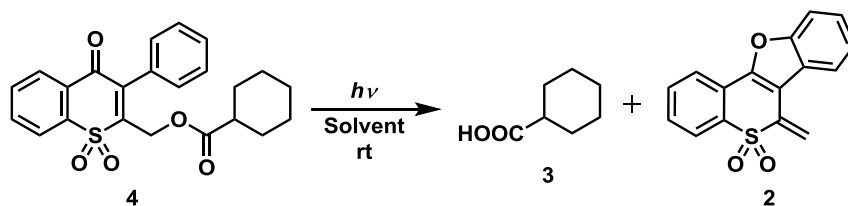
Figure 13. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の UV-Vis スペクトル
溶媒 : DMSO

ϵ : モル吸光係数

その結果、波長 260~400 nm に光吸収帯が確認されたため、ケージドシクロヘキサンカルボン酸は波長 260~400 nm の光照射により脱保護される事が期待された。

次に、ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** に対して光照射を行ない、脱保護評価を実施した。まずは、容易に溶解すると期待される有機溶媒中で検討した。化合物 **4** の 20 mM 溶液 0.5 mL を NMR チューブに入れ、500 W 超高圧水銀灯を光源とし、各種フィルターを通して光照射を実施した。光照射後の各溶液について、直接 1H -NMR 測定を行い、収率を算出した (Table 2)。

Table 2. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の光照射脱保護



Entry	Solvent	Wavelength (nm)	Time (h)	Conversion (%) ^c	Yield of 3 (%) ^c	Yield of 2 (%) ^c
1	CD ₃ OD	>280 ^a	1	>99	>99	0
2	DMSO-D6	>280 ^a	1	98	98	44
3	CD ₃ OD	360 ^b	2	88	88	0
4	DMSO-D6	360 ^b	2	75	75	36

^a Irradiated with ultra high pressure mercury lamp (500 W) through pyrex filter. ^b Through UV-D36B bandpass filter. ^c NMR yield.

その結果、溶媒にメタノール及び DMSO のいずれを使用しても、光照射による脱保護反応は進行し、定量的にシクロヘキサンカルボン酸 **3** が得られたが、溶媒としてメタノールを使用した方がより脱保護反応が速く進行することを確認した (Entries 3, 4)。また、いずれの溶媒を使用してもケージドシクロヘキサンカルボン酸の光照射脱保護反応に伴って、蛍光性の四環性化合物 **2** が副生することを確認した。一方で、**2** は光照射を続けると徐々に分解することが確認され、特にメタノール中において、その分解の程度が顕著であった。実際に、1 時間の光照射を行なうと完全に **2** は分解していた。本検討により、UV-D36B バンドパスフィルターを通した場合に得られる波長 360 nm の光よりも、パイレックスフィルターを通した場合に得られる波長 >280 nm の光の方が、より効率的に脱保護反応を進行させることが可能である事が判明した (Entries 1, 3 及び 2, 4)。

第二項 水溶液中におけるケージドシクロヘキサンカルボン酸の脱保護評価

ここで、ケージド化合物としての利用を考えた場合、水溶液中で利用でき、かつ生体内における光損傷を避けるためにも、長波長紫外光で脱保護できることが望ましい。そのため、 $10\ \mu\text{M}$ のケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** に対して水溶液中で $360\ \text{nm}$ 以上の紫外光を照射することにより脱保護評価を実施した。このような低濃度では NMR 測定による反応追跡は不可能であるため、脱保護過程で蛍光性の四環性化合物 **2** が副生するといった本保護基の特性を活用し、蛍光スペクトルを測定することで反応を追跡した。ここで、化合物 **2** は紫外光照射により徐々に分解することが判明しているため、蛍光スペクトル測定による定量分析は行わず、定性的な分析のみ実施した。以下、いずれの反応も $1\ \text{cm}$ 角の石英セル中に $10\ \mu\text{M}$ の化合物 **4** を $3\ \text{mL}$ 加え、光照射を実施した。

まず、DMSO 溶液を 50% 含んだ水溶液中で、光源として $500\ \text{W}$ 超高压水銀灯を使用し、バンドパスフィルターを用いて $360\ \text{nm}$ の光を照射した。各照射時間における蛍光スペクトルを測定した (Figure 14)。

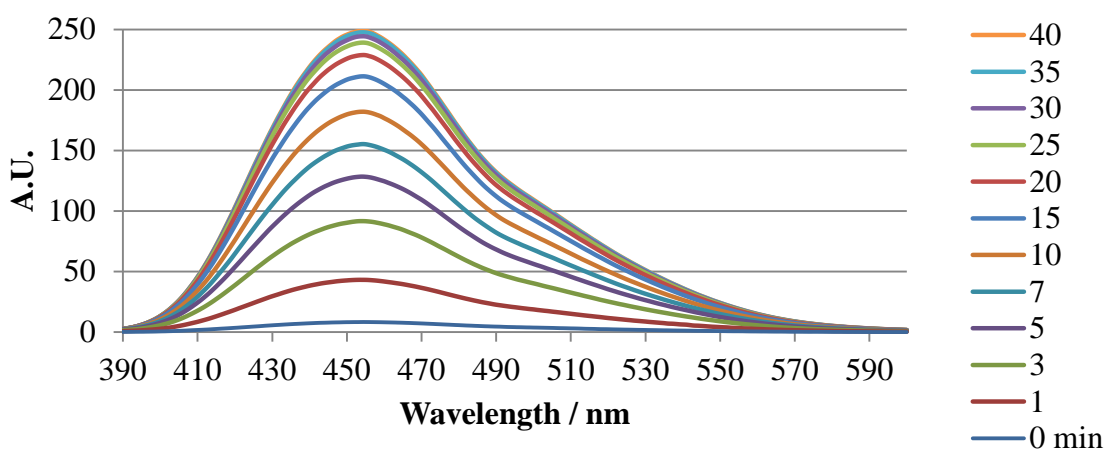


Figure 14. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の光照射脱保護追跡 (1)
溶液: 50% DMSO 含有水溶液; 濃度: $10\ \mu\text{M}$; 光源: 超高压水銀灯 ($500\ \text{W}$); 照射波長: $360\ \text{nm}$ (UV-D36B bandpass filter), 測定条件: バンド幅 $5\ \text{nm}$, 感度 Low

光照射時間依存的に、四環性化合物 **2** 由来の蛍光波長 $454\ \text{nm}$ の蛍光強度が徐々に増加していくことが確認された。一方で、光照射時間 25 分付近より蛍光強度の増加はほぼ観測されなかった。この理由として、光照射により新たに生成する四環性化合物 **2** の量と光照射により分解される **2** の量が等しくなったことが推測される。つまり本結果は、**2** の生成速度と分解速度がほぼ等しくなったことを示唆している。

次に、よりエネルギーの低い光源であるハンディタイプ UV ライト (6 W) に変えて上記と同様の検討を実施した (Figure 15)。

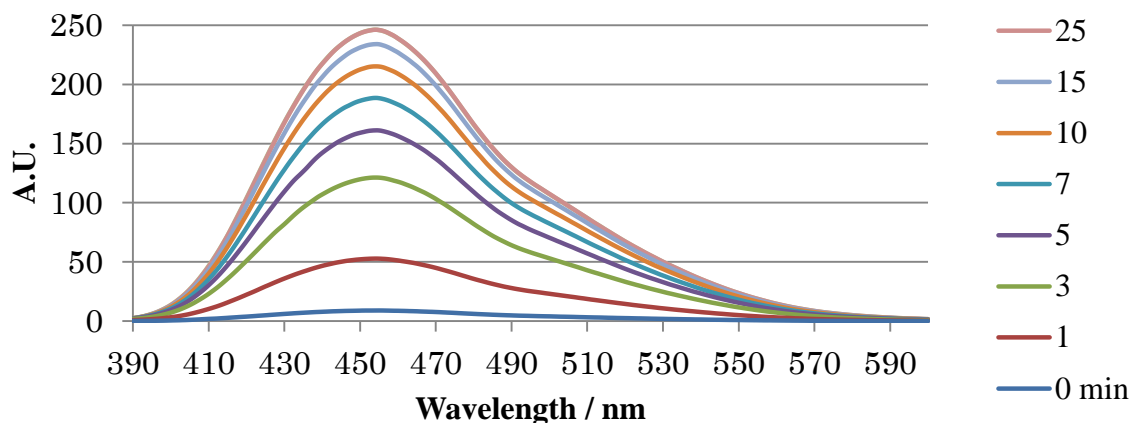


Figure 15. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の光照射脱保護追跡 (2)
溶液 : 50%DMSO 含有水溶液 ; 濃度 : 10 μM ; 光源 : ハンディタイプ UV ライト (6 W) ; 照射波長 : 365 nm, 測定条件 : バンド幅 5 nm, 感度 Medium

検討の結果、光源に超高圧水銀灯を用いた場合とほぼ同等の結果が得られた。本結果から、ケージドシクロヘキサンカルボン酸の光照射脱保護反応では、出力が 6 W というエネルギーの低い光源を用いても十分に脱保護反応が進行することが明らかとなった。

上記の検討では、水溶液中に 50%の DMSO が含まれているため、半分は有機溶媒が含まれていることになる。ここで、一般的な生物学実験では水に難溶解性の化合物を DMSO に溶解し、一部を水溶液中に添加することで、難溶解性の化合物の評価が実施されている⁶。以上のことから、今後ケージド化合物としての利用を見据えた検討を実施するため、DMSO の含有率を 10%まで低下させた水溶液中にて先と同様の検討を実施した(Figure 16)。

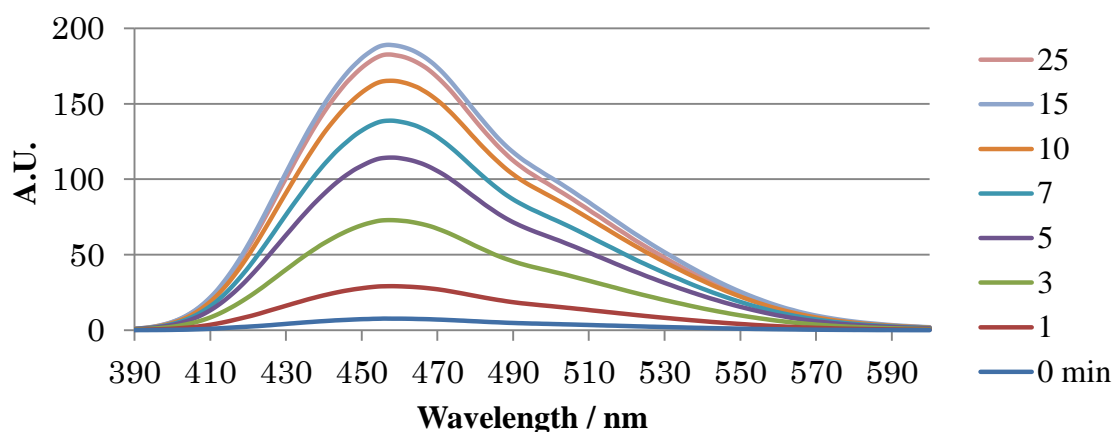


Figure 16. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の光照射脱保護追跡 (3)
 溶液：10%DMSO 含有水溶液；濃度：10 μ M；光源：ハンディタイプ UV ライト (6 W)；照射波長：365 nm, 測定条件：バンド幅 5 nm, 感度 Medium

検討の結果、DMSO の含有率を 10%まで低下させても脱保護反応が進行することは明らかとなったが、四環性化合物 **2** 由来の蛍光強度は DMSO の含有率が 50%の条件下における先の検討結果よりも小さな値を示した。また、光照射時間 15 分時点の蛍光強度に比べて 25 分時点の方が小さな蛍光強度を示した。この結果から、四環性化合物 **2** の分解速度が生成速度を上回ったことが示唆される。

最後に、さらにエネルギーの低い光源である UV-LED ライト(1.5 W)に変えて上記と同様の検討を実施した。

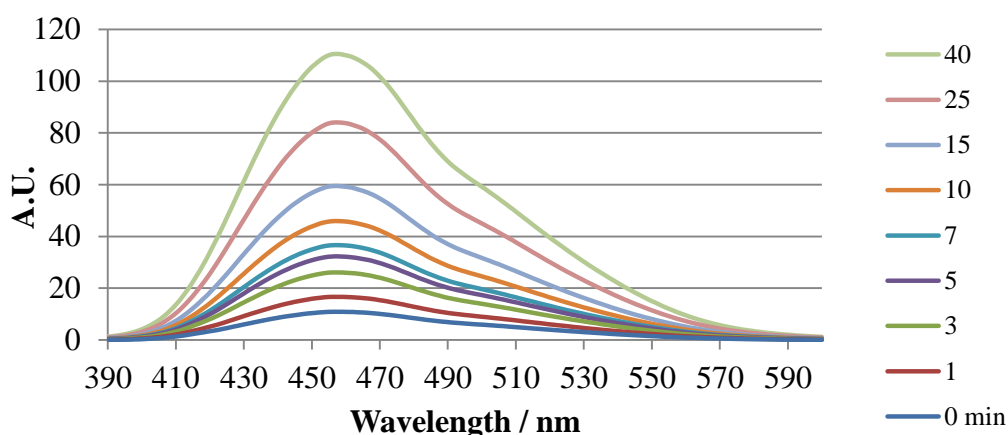


Figure 17. ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の光照射脱保護追跡 (4)
 溶液：10%DMSO 含有水溶液；濃度：10 μ M；光源：UV-LED (1.5 W)；照射波長：365 nm, 測定条件：バンド幅 5 nm, 感度 Medium

Figure 17 に示すように、光源をよりエネルギーの低い UV-LED に変更しても、脱保護反応が進行することを確認した。一方で、光照射時間に対して得られる蛍光強度

の値が低いことから、光照射脱保護反応の効率が低下していることが示唆された。

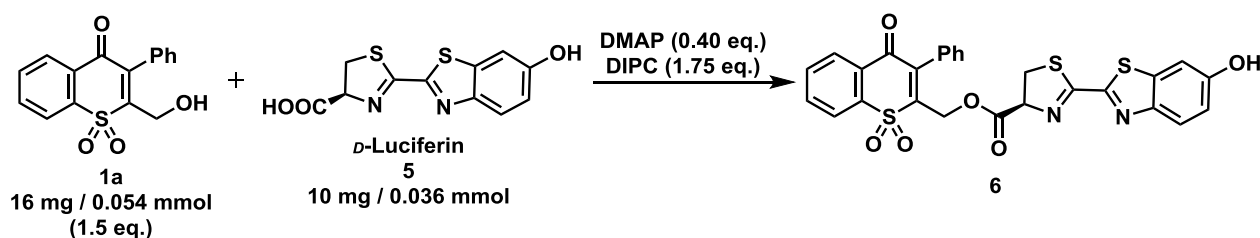
以上の検討結果から、出力の異なるいずれの光源を用いてもケージドシクロヘキサンカルボン酸は DMSO を 10% 含有した水溶液中で、光照射脱保護反応が問題無く進行することが判明した。本検討結果より、チオクロモン型光解離性保護基を導入したケージド化合物が生物学実験へと応用できる可能性が高いことが示唆された。

第五節 新規ケージド *D*-ルシフェリンの合成と *in vitro* 脱保護評価

第一項 新規ケージドルシフェリンの合成

ケージドシクロヘキサンカルボン酸合成で得られた知見をもとに、同様の条件にて *D*-ルシフェリン **5** からケージドルシフェリン **6** の合成を試みた (Table 3)。

Table 3. カルボジイミド法によるケージドルシフェリン **6** の合成



Entry	Method	Temp (°C)	Time	Result
1	DMAP (0.40 eq.) /DIPC (1.75 eq.)/THF	0 °C - rt	0 °C : 2 h rt : 3 h	痕跡量の目的物 6 副生成物 7 が主生成物
2	HOBt (1.0 eq.) /DIPC (1.75 eq.)/THF	rt	6 h	No reaction
3	DMAP (0.40 eq.) /HOBt (1.0 eq.) /DIPC (1.75 eq.)/THF	rt	4 h	目的物 6 を単離収率 21%で取得

ケージドシクロヘキサンカルボン酸 **4** の合成法に従って合成を試みたが、目的化合物 **6** は痕跡量しか得られず、大部分は副生成物 **7** が生成していた (entry 1)。副生成物 **7** は、ルシフェリンのカルボキシル基に DIPC が結合した状態で異性化した化合物であり、一般的にこのような副生成物はカルボジイミド法における副産物として知られている (Figure 18)⁷。そのため、DMAP に代えて、このような副生成物の生成を防ぐ活性化剤の HOBt を用いたが、反応は進行しなかった (entry 2)⁸。一方、DMAP と HOBt の両方を反応系に加えたところ、副生成物 **7** が生成することなく反応が進行し、目的化合物 **6** を単離収率 21%で得ることができた。

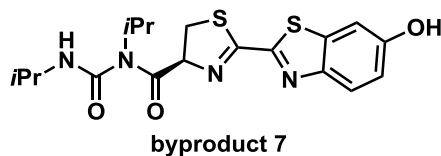


Figure 18. 副生成物 **7**

第二項 ATP 濃度の予備検討

ケージドルシフェリン **6** の細胞内脱保護評価に先立ち、試験管内(*in vitro*)脱保護評価を行うこととした。ルシフェラーゼ、およびマグネシウムイオンの濃度(それぞれ 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 mM)は、試薬メーカーが公表しているルシフェリン-ルシフェラーゼ反応プロトコルを基に決定した⁹。ATP 濃度は、10 μM のルシフェリンを用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を実施し決定することとした。ATP 濃度を実験で決定するのは、本反応が ATP 濃度に大きく依存するからである¹⁰。各濃度の ATP に対してルシフェラーゼ、マグネシウムイオン、ルシフェリンを加え、軽く混ぜ合わせた後、5 分間静置し、ルミノメーターにより 570 nm の発光を測定した。その結果、ATP 濃度を、ATP 濃度と発光値の対数グラフが直線性を担保する範囲内であった 50 nM に決定した(Figure 19)。

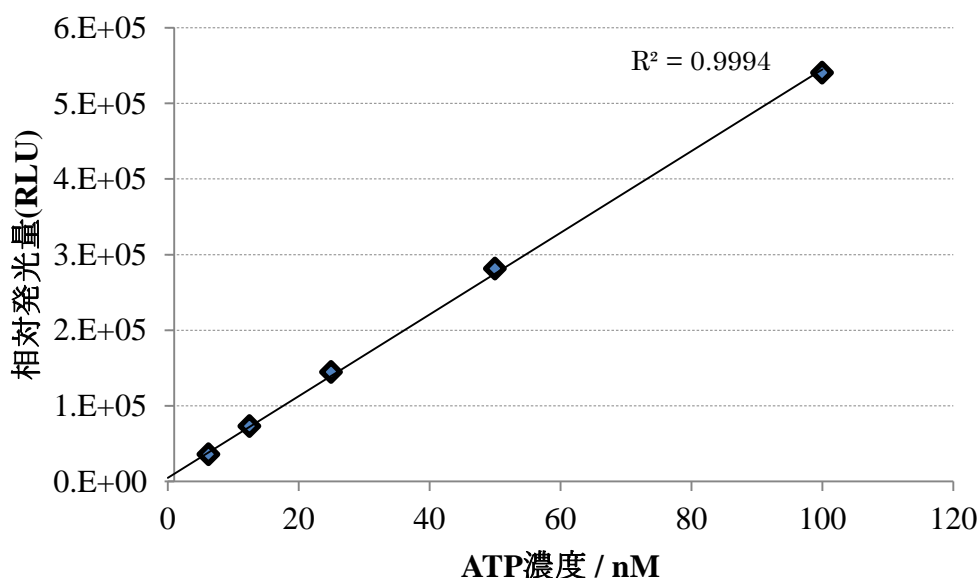


Figure 19. ATP 濃度と相対発光量の関係

ATP 濃度 : 6.25, 12.5, 25, 50, 100 nM

直線 : 最小二乗法による近似

第三項 ルシフェリン濃度の測定レンジに関する予備検討

次に、先の検討で決定した ATP 濃度 50 nM を用いて、濃度を 10 μM 以下に段階希釈した各ルシフェリンに対して発光強度を測定した (Figure 20)。その結果、ルシフェリンの濃度が 10 μM 以下においても、十分な発光強度が得られることが判明した。本検討結果を参考に、*in vitro* 脱保護評価に使用するケージドルシフェリン 6 の濃度を 100 μM に設定した。なお、ケージドルシフェリンに対する光照射は 100 μM の濃度で実施するが、続くルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイは、その十倍希釈である 10 μM で実施する。以上より、ケージドルシフェリンの *in vitro* 脱保護評価を検討するための評価系構築が完了した。

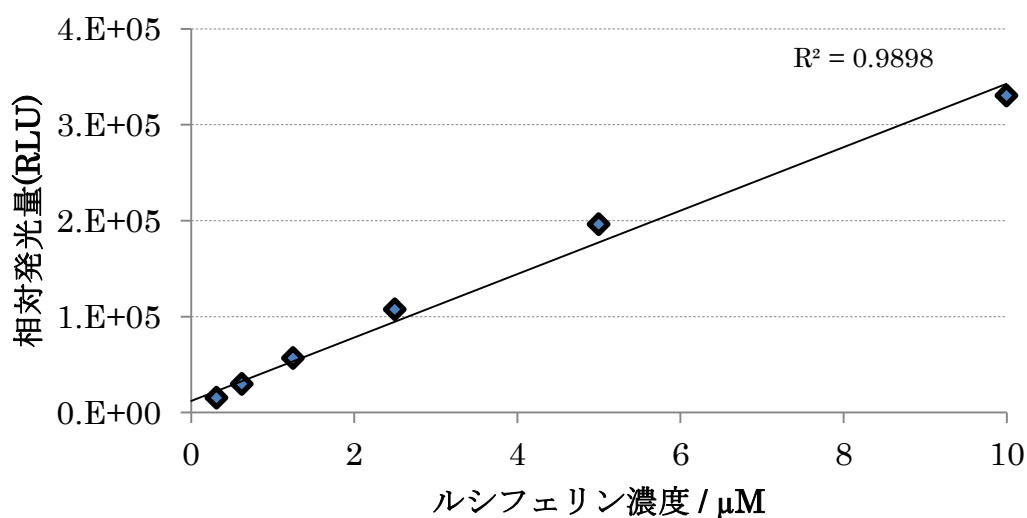


Figure 20. ルシフェリン濃度と相対発光量の関係
ルシフェリン濃度 : 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 μM
直線 : 最小二乗法による近似

第四項 ケージドルシフェリンの *in vitro* 脱保護評価

構築した評価系を用いて、ケージドルシフェリン **6** の *in vitro* 脱保護評価を実施した。光源にハンディタイプ UV ライト (6W, 365 nm) を使用し、光照射時間は後の細胞内脱保護評価を見据えて 10 分を限度とした。その理由は、紫外光照射時間が長くなるほど、細胞にダメージを与える可能性が高いからである¹¹。100 μ M のケージドルシフェリン **6** に対して、365 nm の紫外光を 0, 5, 10 分間照射した後、予め 96 ウェルホワイトプレートに分注していたルシフェラーゼ混合溶液 (ルシフェラーゼ、ATP、マグネシウムイオンを含む、各終濃度は実験項を参照) に加えてプレートを軽く混合し、室温にて 5 分間インキュベートした後に、ルミノメーターにて発光量を測定した。その結果、365 nm の光照射を行っていないケージドルシフェリン水溶液では、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果認められる発光量の値が 2500 であるのに対して、光照射を 5 分実施したケージドルシフェリン水溶液では 4800、光照射を 10 分実施したものでは、6500 の発光量が認められ、光照射時間が増すほど、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に伴う発光量が増加することが確認された (Figure 21)。これは、ケージドルシフェリン **6** が脱保護された結果、機能性のルシフェリン **5** が元の形で正常に再生されただけでなく、光照射時間依存的に脱保護反応が進行したことを示している。一方で、遮光下にて 5, 10 分間インキュベーションした

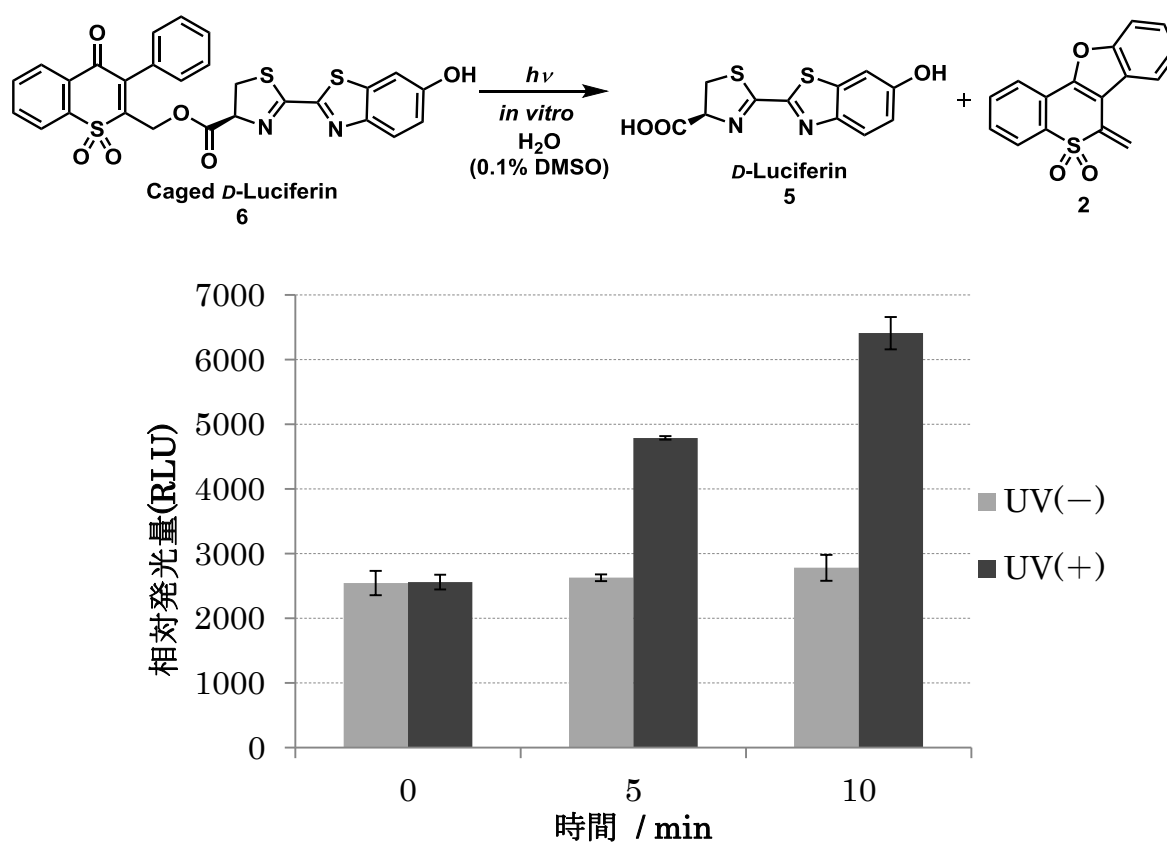


Figure 21. ケージドルシフェリン **6** の *in vitro* 脱保護評価 (n = 3)

ケージドルシフェリン水溶液では、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応に伴う発光量の増加は認められない。これは、本測定条件下においてはケージドルシフェリン自体が水溶液中で安定であり、光を駆動力とする以外には元のルシフェリンを放出していないことを示している。

以上、チオクロモン型光解離性保護基のケージド化合物への適応性を検証した結果、水溶液中において紫外光照射によりケージドルシフェリン **6** の脱保護が進行する事、及び脱保護後に新たに生じたルシフェリン **5** が正常に機能する事、さらに副生している蛍光性化合物 **2** がルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を阻害しない事が明らかとなり、本保護基はケージド化合物へと適用可能であることが証明された。

第五項 ケージドルシフェリンの細胞内脱保護評価

ケージドルシフェリン **6** の細胞内脱保護評価を実施するにあたり、ホタルルシフェラーゼを安定発現したヒト肺癌由来 RERF 細胞 (Luciferase-RERF、以下 Luc-RERF) を利用することとした。評価に先立ち、Luc-RERF 細胞に各濃度のルシフェリンを添加し、その発光量を測定することで Luc-RERF 細胞を用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ反応条件を決定した。まず、ルシフェリンを添加する前日に、96well ホワイトプレートに Luc-RERF 細胞を 4000 cells/well で播種し、5% CO₂ インキュベーター内にて 37 °C、24 時間インキュベートした。その後、各濃度のルシフェリンを添加し、軽く混ぜ合わせ、室温にて 5 分間静置した後、ルミノメーターにより 570 nm の発光を測定した (Figure 22)。

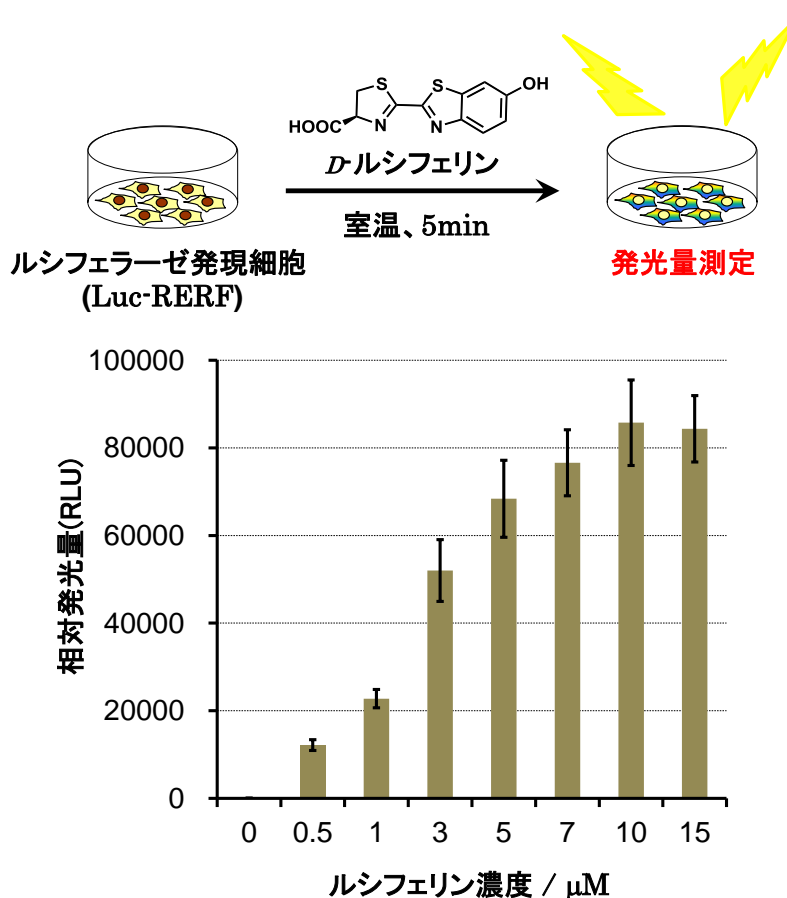


Figure 22. Luc-RERF 細胞におけるルシフェリン濃度と相対発光量の関係

その結果、ルシフェリン濃度が 10 μM 以下においても発光量 10000 以上の十分な発光強度が得られることを確認した。本検討結果を参考に、細胞内脱保護評価に使用するケージドルシフェリン **6** に対する光照射は 100 μM の濃度で実施し、その内の 10 μL を Luc-RERF 細胞培地中に添加し、終濃度 10 μM の条件下においてルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイを実施することとした。アッセイ時に、できるだけ培地組成を変化させないために、光照射後のケージドルシフェリン溶液の持ち込み量は

培地全体の 1/10 に設定した。

構築した評価系を用いて、ケージドルシフェリンの細胞内光脱保護評価を実施した。まず、ルシフェリンを添加する前日に、96well ホワイトプレートに Luc-RERF 細胞を 4000cells/well で播種し、5% CO₂ インキュベーター内にて 37 °C、24 時間インキュベートした。翌日、ケージドルシフェリンを終濃度 10 μM になるように細胞培養液に添加し、5% CO₂ インキュベーター内にて 37 °C、5 分間インキュベートした。その後、ハンディタイプ UV ライト (6W, 365 nm) にて細胞外より波長 365 nm の光を 10 分間照射した後、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応による発光量を安定させるために、室温で 5 分間インキュベーションした。その後、ルミノメーターにて 570 nm の発光量を測定した (Figure 23)。

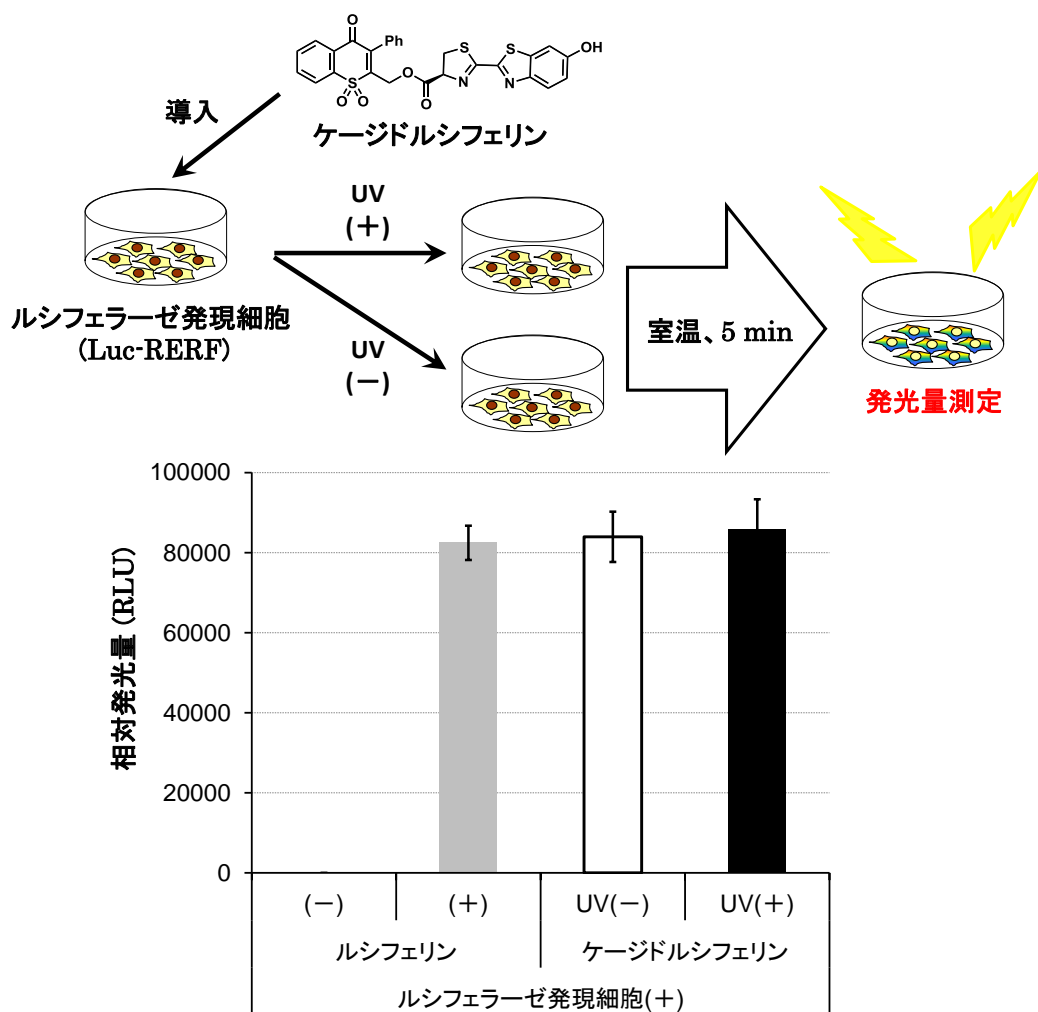


Figure 23. ケージドルシフェリンの細胞内光脱保護評価

その結果、光照射の有りに関わらず、ケージドルシフェリンを添加した Luc-RERF 細胞では強い発光が認められた。これは、ケージドルシフェリンを細胞内に導入した際に、細胞内エステラーゼによりエステル結合の加水分解が進行し、元のルシフェリンが放出されてしまったことを示唆している。一般的に、細胞内にはエス

テル分解酵素であるカルボキシルエステラーゼ (Carboxylesterase, CES) が恒常的に発現しているため、エステル結合を有した分子は短時間のうちに CES の作用により分解されてしまうことが報告されている¹²。そのため、本検討では細胞内に取り込まれたケージドルシフェリンが、光照射の有無に関わらず短時間のうちに CES の作用で分解されたと考えられる。このように CES の作用により生じた遊離のルシフェリンが、次々にルシフェリンールシフェラーゼ反応により消費されてしまった事が、光照射による脱保護を明確に捉えることが出来なかった主な原因と考えられる。さらに、ルシフェリンールシフェラーゼ反応により生じるオキシルシフェリンの発光半減期が数分間と短寿命である点も、光照射による脱保護を明確に捉えることが出来なかった可能性の一つと考えられる¹³。その理由は、細胞内で新たに生じたオキシルシフェリンは発光後、数分以内には完全に消光してしまうことから、脱保護により生じる生理活性分子由来のシグナル寿命が非常に短くなってしまふ為である。

この結果から、細胞内脱保護を成功させるためには、細胞内エステラーゼにより分解される懸念をもつエステル結合を介してケージド化合物を合成するのではなく、細胞内酵素により分解される懸念の低いもしくは全く無い結合様式によりケージド化合物を合成する必要性が考えられる。本結果を受けて、ケージドルシフェリンを使用した細胞内光脱保護評価は困難であると判断し、これ以上の検討は実施しない方針とした。

一般的に、細胞内にはカルボキシルエステラーゼ 1 及び 2 (CES1, CES2)が発現していることが報告されている¹⁴。X 線構造解析の結果から、CES1 の活性中心は rigid site と flexible site から構成され、幅広い空間を有することが明らかとなっている¹⁵。一方、CES2 はアミノ酸配列において、flexible site を構成するループの一つが欠損しており、CES1 に比べると活性中心の flexibility が劣ると考えられる。そのため、ヒト CES2 が嵩高いアシル基を持つ化合物を加水分解しないのは、活性中心の立体的な障害のために、加水分解の第一ステップであるアシル基と CES セリン残基との結合が妨げられ、限られた大きさのアシル基しか結合できないためであると考えられている¹⁶。つまり、CES2 に比べて CES1 の方が、酵素の活性部位が空間的に広い (活性ポケットが広い) ことから、基質認識の許容度が高いと考えられている。ここで、ヒトの肺組織では CES2 はほとんど発現しておらず、CES1 が高発現していることが明らかとなっている¹⁷。本検討の細胞内光脱保護評価に使用したルシフェラーゼ発現細胞 Luc-RERF は、ヒト肺癌由来細胞のため、主に CES1 が高発現していると考えられる。そのため、本検討で用いたケージドルシフェリンは、主に CES1 に基質として認識され、加水分解作用を受けたと考えることができる。CES1 に比べて CES2 の方が基質認識の許容度が低い¹⁶ ことから、立体的に嵩高いチオクロモン型保護基を導入した本ケージドルシフェリンは、CES2 の基質になり得ない可能性が期待できる。今後の展望として、CES1 がほとんど発現しておらず、主に CES2 が発現しているヒト小腸及び腎臓由来の細胞を評価に利用することで、本ケージドルシフェリンの細胞内光脱保護を達成できる可能性がある。

第六節 小括

第二章では、ホタルルシフェラーゼの基質である *D*-ルシフェリンをターゲット分子に選定し、ケージドルシフェリンの合成及び評価を実施することで、チオクロモン型光解離性保護基のケージド化合物への適応性を検証した。

第一節～第四節では、ルシフェリンのモデル分子としてシクロヘキサンカルボン酸を選択し、ケージドシクロヘキサンカルボン酸を合成した。また、ケージドシクロヘキサンカルボン酸の光脱保護検討により、水溶液中で 365 nm の長波長紫外光でも脱保護が進行し、元のシクロヘキサンカルボン酸が得られるのみならず、蛍光性の四環性化合物が副生することを確認した。さらに、四環性化合物の蛍光を活用することで、脱保護反応を追跡することができた。

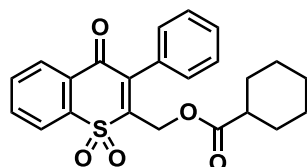
第五節では、本保護基を用いたケージドルシフェリンの合成に成功した。続いて、水溶液中において 365 nm の長波長紫外光照射によりケージドルシフェリンの脱保護が進行すること、及び脱保護後に新たに生じたルシフェリンがホタルルシフェラーゼの基質として正常に機能することを実証することにより、本チオクロモン型光解離性保護基がケージド化合物へと適用可能であることを証明することができた。一方で、ルシフェリン分子自体が蛍光特性を有していること¹⁸から、本検討ではチオクロモン型保護基の特徴である、光脱保護後に副生する四環性化合物由来の蛍光を活用するには至らなかった。また、ルシフェラーゼ発現細胞を用いたケージドルシフェリンの細胞内光脱保護検討では、光照射の有り無しに関わらず、ケージドルシフェリンを添加した細胞で強い発光が認められた。この結果から、ケージド化合物を細胞内へと利用するためには、細胞内酵素で加水分解を受けるエステル結合を介して本保護基を導入する戦略は不適であるといった知見を得ることができた。

以上、第二章における検討から、今後新たなケージド化合物を開発する際には、①生理活性分子自体が 365 nm の光を吸収しない事、②エステラーゼのような細胞内酵素により分解されない結合様式で光解離性保護基を導入する事、③脱保護後の生理活性分子の半減期が長い事、④脱保護に伴い副生する四環性化合物の蛍光を活用できる事、といった項目を全て満たすターゲット分子が望ましい、といった重要な知見を得ることができた。

第七節 実験項

TLC 板.....MERCK mesh size 60Å
検出.....UV ランプ (254 nm) もしくはアニスアルデヒド呈色試薬
シリカゲル.....MERCK 40–63 μm silica gel 60
中性シリカゲルKANTO 40–100 μm silica gel 60N
NMR.....JEOL JNM–ECP 500 ¹H NMR 500MHz, ¹³C NMR 125 MHz
内部標準 ¹H NMR TMS (0 ppm), CDCl₃ (7.26 ppm), THF-*d*₈ (3.58, 1.72 ppm)
..... ¹³C NMR CDCl₃ の中点のピーク (77 ppm)
融点Yanaco MP-500D
IRJASCO FT/IR-4200
MS.....JEOL JMS-700, EI, CI, FAB or ESI
UV-Vis.....JASCO V-630, 1 cm の光路長のセルを用いた
超高圧水銀灯USHIO SX-UI 500H0
メカニカル攪拌機...NAKAMURA MS-8
中圧カラム.....Biotage Isolera One, SNAP HP-Sil Cartridge
UV ランプフナコシ Handheld UV Lamp, 6 W, UVL-56, 365 nm, 100 V
ルミノメーターMolecular Device SpectraMax L (RLU/0.25 sec)

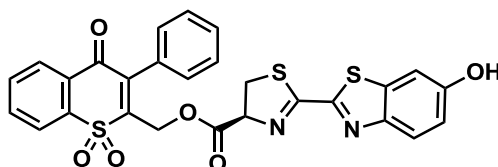
(1,1-Dioxido-4-oxo-3-phenyl-4*H*-thiochromen-2-yl)methyl
cyclohexanecarboxylate (**4**)



窒素雰囲気下、室温にて基質 **1a** (0.12 mmol, 36 mg) を塩化メチレン (1.0 mL) に溶かし、次いで *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (0.032 mmol, 3.9 mg)、シクロヘキサンカルボン酸 (0.080 mmol, 10 mg)、を加えた。0 °C にて *N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (0.14 mmol, 18 mg) を加え、0 °C のまま 3.5 時間攪拌した。TLC 上で基質がほとんど消失したことを確認した後、1N 塩酸を加えて反応を止め、塩化メチレンで抽出し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。粗生成物を中圧カラムで精製し、化合物 **4** を黄色油状物質として 16.9 mg、収率 51% で得た。

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ: 8.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.89 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.78 (t, *J* = 8.0 Hz), 7.48–7.46 (m, 3H), 7.29–7.26 (m, 2H), 5.01 (s, 2H), 2.39–2.33 (m, 1H), 1.95–1.92 (m, 2H), 1.77–1.74 (m, 2H), 1.65–1.60 (m, 1H), 1.48–1.40 (m, 2H), 1.32–1.20 (m, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ: 178.43, 174.86, 145.11, 144.33, 140.71, 134.69, 133.19, 130.91, 129.65, 129.03, 129.00, 128.88, 128.42, 123.10, 57.71, 42.82, 28.73, 25.62, 25.31. IR (neat) ν_{max} : 2933, 2856, 1739, 1667, 1310, 1164 cm⁻¹. HRMS (ESI) Calcd for C₂₃H₂₂NaO₅S: 433.1086; Found 433.1083.

(*S*)-(1,1-Dioxido-4-oxo-3-phenyl-4*H*-thiochromen-2-yl)methyl
2-(6-hydroxybenzo[*d*]thiazol-2-yl)-4,5-dihydrothiazole-4-carboxylate (**6**)



窒素雰囲気下、室温にて基質 **1a** (0.16 mmol, 48 mg) を THF (9.0 mL) に溶解し、続いて 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (0.11 mmol, 14 mg)、*D*-ルシフェリン (0.11 mmol, 30 mg)、*N,N'*-ジイソプロピルカルボジイミド (0.19 mmol, 24 mg) を加え、最後に *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (0.043 mmol, 5.1 mg) を加えた。溶液は薄黄色から薄赤色に変化した。室温で 4 時間攪拌した後、1N 塩酸を加えて反応を止めた (溶液は赤色から薄黄色に変化)。酢酸エチルで抽出し、飽和重層水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (中性シリカゲル、ヘキサン : 酢酸エチル = 3 : 2) を 3 回行って精製し、化合物 **6** を薄黄色固体として 13 mg、収率 21% で得た。

¹H NMR (THF-*d*₈, 500 MHz) δ: 8.99 (s, 1H), 8.18 (dd, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 8.12 (dd,

$J = 8.0, 1.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.94 (dt, $J = 8.0, 1.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.87 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 7.82 (dt, $J = 8.0, 1.5 \text{ Hz}$, 1H), 7.42–7.38 (m, 5H), 7.30 (d, $J = 2.5 \text{ Hz}$, 1H), 6.99 (dd, $J = 8.0 \text{ Hz}, 2.5 \text{ Hz}$), 5.37 (t, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 1H), 5.16 (d, $J = 12.5 \text{ Hz}$, 1H), 5.00 (d, $J = 12.5 \text{ Hz}$, 1H), 3.75–3.66 (m, 2H). ^{13}C NMR (THF- d_8 , 125 MHz) δ : 178.59, 169.26, 166.84, 158.44, 157.73, 147.96, 145.63, 144.47, 141.77, 138.66, 135.24, 133.69, 132.41, 130.35, 130.10, 129.80, 129.02, 128.62, 125.66, 123.69, 117.43, 106.98, 79.05, 58.87, 35.04. IR (neat) ν_{max} : 2360, 1742, 1668, 1306, 1216, 1170 cm^{-1} . HRMS (ESI) Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_3$: 585.0225; Found 585.0226.

ルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイ

[Solution A] (酵素ストックバッファー)

1 M Tris-HCl pH7.8 125 μL 、5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (酵素の安定化剤として添加) 200 μL 、glycerol 750 μL 、ethylene glycol (グリセロール及びエチレングリコールを加える目的: 酵素を -20°C 以下で保存する必要があるため、溶液が -20°C でも凍らないように不凍液にする目的で添加する。酵素は凍結融解を繰り返すと活性が失われていくため、凍結融解を防ぐために不凍液中で保存する必要がある) 1500 μL を混合させ、DW(蒸留水)を5000 μL になるまでメスアップすることで調製する。最終濃度はそれぞれ25 mM、0.2 M、15 v/v %、30 v/v %となる。

[Luciferase Stock Solution]

Luciferase 1000 μg と Solution A 200 μL を混合することにより調製する。

[20×Reaction Buffer]

1 M Tris-HCl pH7.8 5 mL、1 M MgSO_4 1 mL、0.5 M EDTA (酵素は酸化されると失活するため、抗酸化剤として添加) 40 μL を混合させ、DWを10 mLになるまでメスアップすることで調製する。最終濃度はそれぞれ500 mM、100 mM、2 mMとなる。

ATP 濃度の予備検討

20×Reaction Buffer 50 μL 、1 M DTT (タンパク質は酸化されると分子内のSH基同士が結合し、S-S結合(ジスルフィド結合)を形成する。その結果、タンパク質の立体構造が変化(変性)し、酵素としての機能が失われるため、DTTを加えて還元状態にすることで酵素の酸化を防ぐ目的で添加する) 10 μL 、200 μM D-Luciferin 50 μL 、Luciferase Stock Solution 0.25 μL を混合し、DWを900 μL になるまでメスアップし、Standard Reaction Solutionを調製する。予め96 well ホワイトプレートに10 μL ずつ分注した各濃度のATP溶液に対して、Standard Reaction Solutionを90 μL ずつ添加する。終濃度はDTT 0.1 M、D-Luciferin 10 μM 、Luciferase 5 mg/mL

となる。各 ATP の終濃度は 6.25、12.5、25、50、100 nM の 5 種類となる。この 96well ホワイートプレートを軽く揺すって溶液を混合させた後、室温にて 5 分間インキュベートする。その後、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

ルシフェリン濃度の測定レンジに関する予備検討

20×Reaction Buffer 50 μ L、1 M DTT 10 μ L、Luciferase Stock Solution 0.25 μ L、10 μ M ATP 5 μ L を混合させ、DW を 900 μ L になるまでメスアップし、Standard Reaction Solution とする。96 well ホワイートプレートに各濃度の *D*-Luciferin を 10 μ L ずつ分注する。これに Standard Reaction Solution を 90 μ L ずつ添加する。各試薬の終濃度は DTT 0.1 M、Luciferase 5 mg/mL、ATP 50 nM となる。*D*-Luciferin は終濃度が各 0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10 μ M の 5 種類となる。この 96well ホワイートプレートを軽く揺すって溶液を混合させた後、室温にて 5 分間インキュベートする。その後、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

ケージドルシフェリン 6 の光照射脱保護評価

20×Reaction Buffer 50 μ L、1 M DTT 10 μ L、Luciferase Stock Solution 0.25 μ L、10 μ M ATP 5 μ L を混合させ、DW を 900 μ L になるまでメスアップし、Standard Reaction Solution とする。続いて、100 μ M ケージドルシフェリン水溶液 (0.1% DMSO を含有) に対してハンディタイプ UV ランプ (フナコシ社製) にて 365 nm の UV を照射した後、96 well ホワイートプレートに各 UV 照射 (+/-) サンプル (コントロール実験は遮光下にてインキュベート) を 10 μ L ずつ分注する。これに Standard Reaction Solution を 90 μ L ずつ添加する。終濃度は DTT 0.1 M、Luciferase 5 mg/mL、ATP 50 nM、UV 照射 (+/-) ケージドルシフェリン 10 μ M となる。この 96well ホワイートプレートを軽く揺すって溶液を混合させた後、室温にて 5 分間インキュベートする。その後、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

Luc-RERF 細胞におけるルシフェリン濃度の測定レンジに関する予備検討

Luc-RERF 細胞の培養には、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地 (10% ウシ胎児血清 (略語表参照; FBS)、1% ペニシリン-ストربتマイシン (略語表参照; P/S) を含有) を使用した。まず、ルシフェリンを添加する前日に、Luc-RERF 細胞を 96well ホワイートプレートに 4000 cells/well で播種し CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C 条件で 24 時間インキュベーションする。翌日、各濃度に調製したルシフェリン溶液を、培養液中の Luc-RERF 細胞に各 10 μ L ずつ添加し、ルシフェリンの終濃度が 0.5, 1, 3, 5, 7, 10, 15 μ M となるようにする。この 96well ホワイートプレートを軽く揺すって添加したルシフェリン濃度が均一にさせた後、室温にて 5 分間インキュベートする。その後、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

ケージドルシフェリン 6 の細胞内光脱保護評価

ケージドルシフェリンを添加する前日に、Luc-RERF 細胞を 96well ホワイトプレートに 4000 cells/well で播種し CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C 条件で 24 時間インキュベーションする。翌日、100μM に調製したケージドルシフェリン水溶液を 96well ホワイトプレート中の Luc-RERF 細胞に 10 μL 添加して終濃度を 10 μM にし、この 96well ホワイトプレートを軽く揺すって溶液を混合させた後、CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C 条件で 5 min インキュベーションする。続いて、96well ホワイトプレート上部からハンディタイプ UV ライト (6W, 365 nm) にて細胞外より光を 5 分間照射した後、室温にて 5 分間インキュベートし、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

第八節 参考文献

- 1) 加藤博章; 中津亨, 生化学, **2007**, *79*, 697.
- 2) H.H. Seliger; W.D. McEltory, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **1960**, *88*, 136.
- 3) J. Yang; D. B. Thomason, *BioTechniques* **1993**, *15*, 848.
- 4) Q. Shao; T. Jiang; G. Ren; Z. Cheng; B. Xing, *Chem. Commun.* **2009**, 4028.
- 5) S. Kitani; K. Sugawara; K. Tsutsumi; T. Morimoto; K. Kakiuchi, *Chem. Commun.*, **2008**, 2103.
- 6) L. Di; E. H. Kerns, *Drug Discovery Today*, **2006**, *11*, 446.
- 7) R. B. Merrifield; B. F. Gisin; A. N. Bach, *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 1291.
- 8) W. König; R. Geiger, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1970**, *103*, 788.
- 9) Promega: <https://www.promega.com/> ; Molecular Probes:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>
- 10) G. E. Lyman; J. P. DeVincenzo, *Analytical Biochemistry*, **1967**, *21*, 435.
- 11) S. Menezes; B. Coulomb; C. Lebreton; L. Dubertret, *The Journal of Investigative Dermatology*, **1998**, *111*, 629.
- 12) F. F. Craig; A. C. Simmonds; D. Watmore; F. Mccapra; M. R. White, *Biochem. J.*, **1991**, *276*, 637.
- 13) K. V. Wood, *Promega Corporation: US Patent 5, 650, 289*, **1997**.
- 14) T. Satoh; M. Hosokawa, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1998**, *38*, 257.
- 15) M. R. Redinbo; P. M. Potter, *Drug Discovery Today*, **2005**, *10*, 313
- 16) T. Imai, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **2006**, *21*, 173.
- 17) M. Hosokawa, *Molecules*, **2008**, *13*, 412.
- 18) Y. Ando; H. Akiyama, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **2010**, *49*, 117002.

第三章 細胞内光脱保護を指向した新規ケージド核酸の開発

第一節 ターゲット分子の選定

第二章の検討結果より、ケージド化合物を開発する際には、①生理活性分子自体が 365 nm の光を吸収しない事、②エステラーゼのような細胞内酵素により分解されない結合様式で光解離性保護基を導入する事、③脱保護後の生理活性分子の半減期が長い事、④脱保護に伴い副生する四環性化合物の蛍光を活用できる事、といった項目を全て満たすターゲット分子の選抜が重要である事が判明した。第三章ではこれら知見を活用し、細胞内光脱保護を指向した新たなケージド化合物を開発するためにデオキシリボ核酸 (DNA) の一種であるチミジンをターゲット分子に選定した。チミジンは、五炭糖のデオキシリボースがピリミジン塩基のチミンに結合した構造をしており、DNA の二重鎖中において相手方の核酸塩基であるデオキシアデノシン内のアデニン部位と二本の水素結合を形成することが広く知られている (Figure 24)¹。

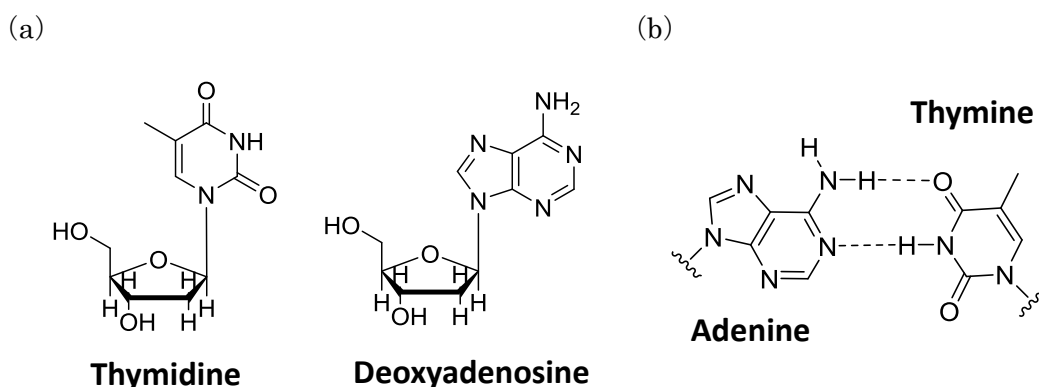


Figure 24. (a)チミジン及びデオキシアデノシンの構造

(b)チミン-アデニン間の水素結合 (Watson-Crick 塩基対)

この結合は一般的に Watson-Crick 塩基対と呼ばれているが、他にグアニン-シトシン間の三本の水素結合形成による同塩基対が知られている。今回著者は、グアニン-シトシン間より相互作用の弱い、チミン-アデニン間の Watson-Crick 塩基対の阻害を優先的に考え、四種類ある DNA の中でチミジンをターゲット分子に選定した。デオキシアデノシンよりもチミジンを選択した理由としては、チミジンのチミン塩基部位への保護基導入に関して多数報告例があり、その方法論を参考にできると考えたためである^{2,3}。さらに、チミジンは波長 320 nm 以上の光を吸収しないことが報告されているため、波長 320 nm 以上の光を光源として使用した場合、チミジン自体が光照射脱保護反応を阻害する懸念も無い⁴。

一方で、現在までに目的の遺伝子由来の mRNA に相補的な、10~25 量体 (mer) の短鎖の一本鎖 DNA (single strand DNA, ssDNA) であるアンチセンスオリゴヌクレオチド (antisense oligonucleotides, ASO) を細胞内に導入すると、細胞核内にお

いて標的 mRNA と二重鎖を形成した結果、核内 RNA 分解酵素の一種である RNaseH の作用により mRNA の分解を引き起こし、結果的にリボソームによる mRNA の翻訳を阻害できることが報告されている (Figure 25)⁵⁻⁷。この ASO を利用することで、目的遺伝子の発現量を意図的に抑制させることが可能であることから、創薬ターゲット探索時のバリデーションツールとしての利用や、抗体医薬品に代わる次世代の医薬品として、製薬企業各社により近年盛んに研究開発が行われている⁸。

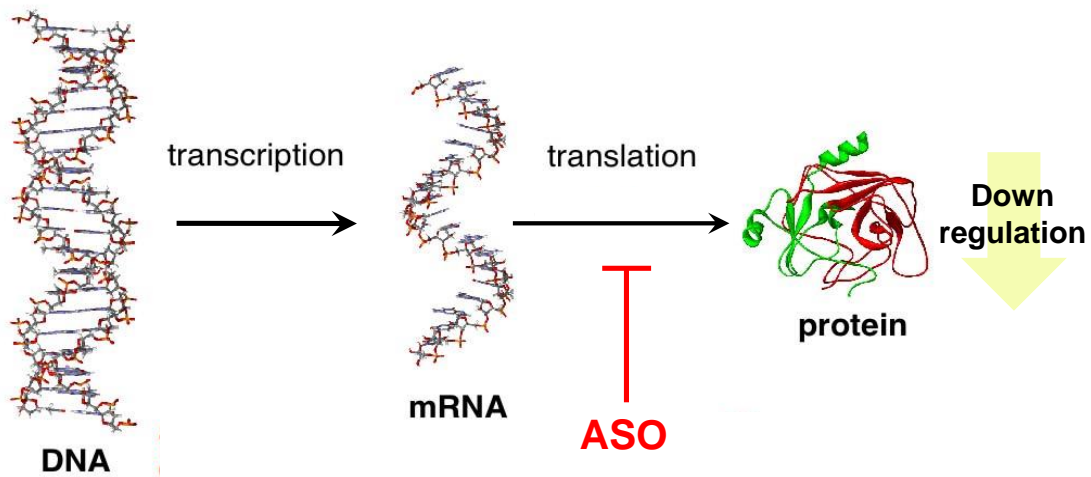


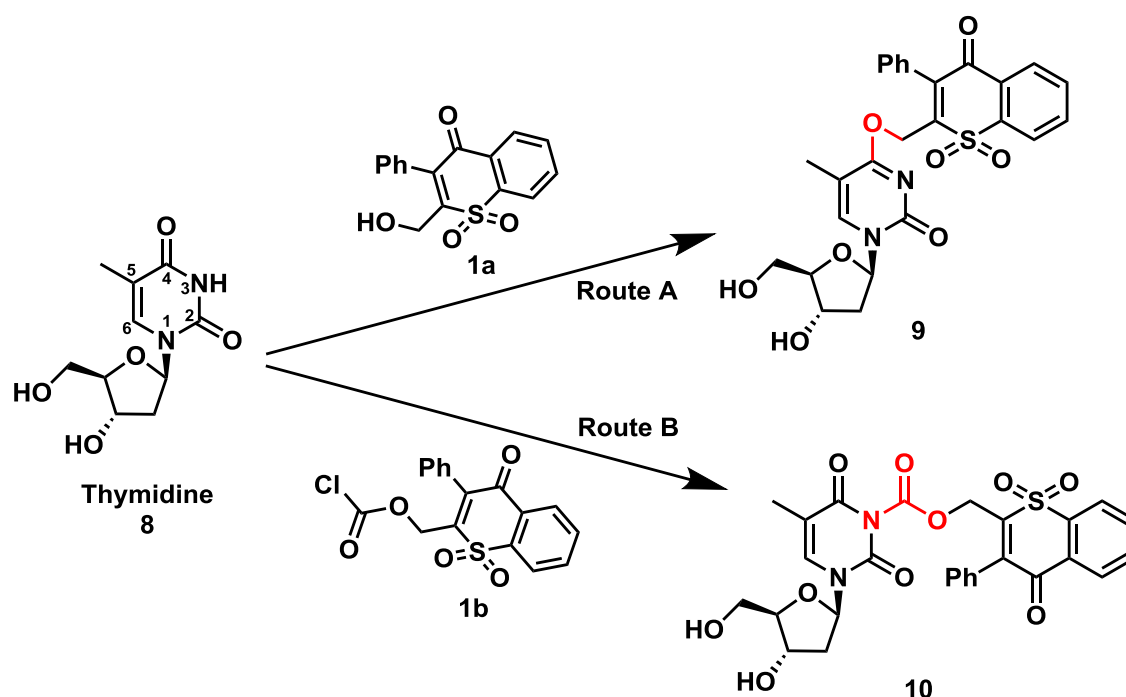
Figure 25. 生物学のセントラルドグマと ASO による mRNA 翻訳阻害

今回著者はこれら二種類の知見を統合することで、目的の遺伝子の発現を光照射のみで制御可能とするための戦略を立案した。具体的には、チミジン内のチミン塩基部位にチオクロモン型光解離性保護基を導入したケージドチミジンを合成し、このケージドチミジンを先述の ASO に組み込むことで、光照射により機能制御が可能で且つ脱保護過程を蛍光測定で追跡可能なケージド ASO の開発を目指した。

第二節 新規ケージドチミジンの合成と脱保護評価

第一項 チミジンへのチオクロモン型光解離性保護基の導入方法の考察

チミジン **8** へのチオクロモン型光解離性保護基 **1** の導入を考えた場合、現時点で技術的に可能な導入方法として、次の二種類が考えられる。一つ目は、アルコール型保護基 **1a** を用いてチミン塩基部位の *O*-4 部位へエーテル結合を介して導入する方法 (Route A) である。二つ目は、クロロホルメート型保護基 **1b** を用いてチミン塩基部位の *N* 部位へカルバメート結合を介して導入する方法 (Route B) である (Scheme 8)。

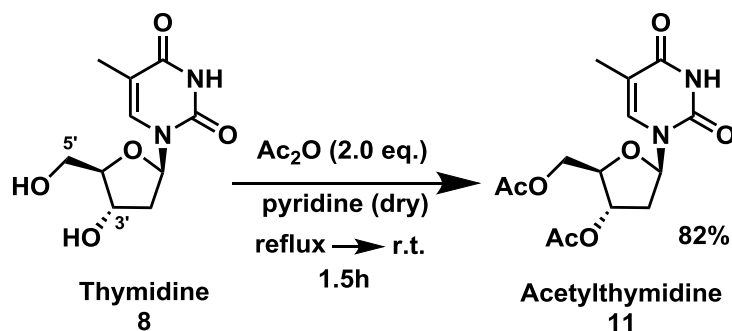


Scheme 8. チミジン **8** へのチオクロモン型光解離性保護基の導入戦略

ここで、第二章ケージドトルシフェリンの検討から、ケージド化合物を細胞内で利用する場合にはチオクロモン型光解離性保護基をエステラーゼのような細胞内酵素により分解されない結合様式で導入することが望ましい事が判明している。Route Bの方法では、カルバメート結合を介して保護基を導入するが、過去の報告によりカルバメート結合は細胞内のカルボキシルエステラーゼにより加水分解を受けることが判明している⁹。そのため、今回著者は細胞内酵素による分解を受ける懸念の無いエーテル結合を介して、チオクロモン型光解離性保護基を導入する Route A を選択した。

第二項 O-4 部位ケージドアセチル化チミジンの合成

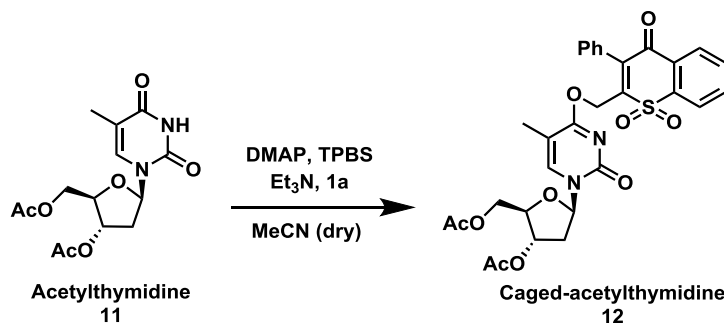
まず、チミジンへのチオクロモン型光解離性保護基の導入に先立ち、反応性の高いチミジン分子内デオキシリボースの3'位及び5'位のヒドロキシル基部位をアセチル基で保護することとした (Scheme 9)。



Scheme 9. チミジンのアセチル化

まず、文献²に従いチミジンをピリジンに溶解させた後、無水酢酸を添加し 90 °C で 30 分間加熱攪拌させた。その後、室温にて 1 時間反応させることで目的のアセチル化チミジン (Ac-チミジン) **11** を収率 82% で得た。続いて、Ac-チミジンのチミン

Table 4. Ac-チミジンへのチオクロモン型光解離性保護基の導入



Entry	DMAP (eq)	TPBS (eq)	Et ₃ N (eq)	1a (eq)	反応時間 / h		反応温度 / °C		12 %
					活性化	1a 添加後	活性化	1a 添加後	
1	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	17	r.t.	r.t.	0
2	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	17	r.t.	30	2
3	1.5	1.5	2.0	2.0	48	24	r.t.	30	12
4	1.5	1.5	2.0	2.0	48	24	45	45	17
5	0.2	1.2	2.0	1.0	1.0	1.0	45	45	8
6	0.2	1.2	2.0	1.5	4.0	1.5	45	45	8
7	0.2	1.2	2.0	1.0	4.0	3.0	45	45	9
8	0.2	1.2	3.0	1.0	4.0	12	45	45	27

TPBS: 2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonyl chloride

DMAP: 4-Dimethylaminopyridine

塩基 *O*-4 部位へのチオクロモン型光解離性保護基の導入を検討した (Table 4)。

まず Entry 1 では、Heckel らの先行文献²に従い、**11** をアセトニトリルに溶解させた後、DMAP、Et₃N、TPBS を添加し、室温にて基質 **11** を活性化させた。活性化 3 時間後に **1a** を添加した後、17 時間反応させたが目的化合物 **12** を得ることはできなかった。次に、Entry 2 において **1a** 添加後の反応温度を室温から 30 °C まで昇温させることで、わずか 2 %ではあるが、目的化合物 **12** を得ることができた。続く Entries 3–5 では、反応温度を検討した結果、反応温度 45 °C において目的化合物 **12** を収率 17 %で得ることができた。そのため、今後の反応温度は 45 °C とした。Entries 6–8 では、各試薬の等量および反応時間を検討した。その結果 Entry 8 の条件で反応を行うことで、目的化合物 **12** の収率を 27 %まで向上させることができた。以上の検討から、本条件を Ac-チミジンへのチオクロモン型光解離性保護基を導入する際の最適化条件とした。

第三項 O-4 部位ケージドアセチル化チミジンの光照射脱保護検討

まず、O-4 部位ケージドアセチル化チミジン **12** (ケージド Ac-チミジン) の光照射脱保護検討に先立ち、ケージド Ac-チミジンの UV-vis スペクトル測定を実施し光吸収波長を見積もった (Figure 26)。

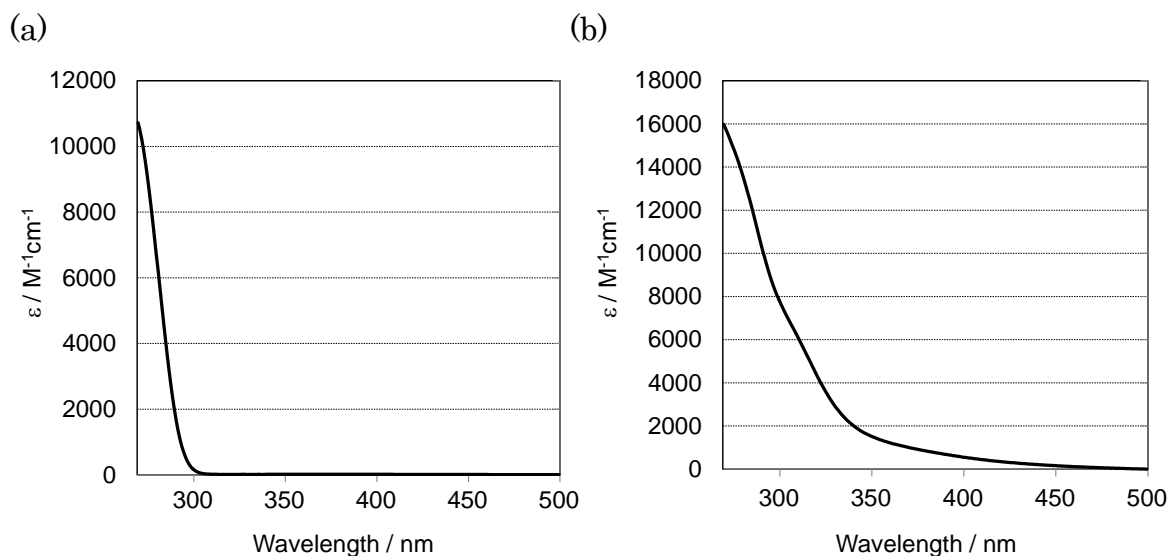


Figure 26. (a) Ac-チミジン **11**, (b) ケージド Ac-チミジン **12** の UV-vis スペクトル

溶液：1% DMSO 含有水溶液；濃度：100 μM

ϵ ：モル吸光係数

将来的なケージド化合物としての利用を考慮した場合、ケージド Ac-チミジン **12** が低濃度かつ水溶液中にて光脱保護されることが必要条件となるため、本測定では、ケージド Ac-チミジンの UV-vis スペクトルを低濃度 (100 μM) かつ水溶液中にて測定した。ここで **12** は水に難溶性であるため、あらかじめ DMSO に溶解させ 10 mM 溶液を調製した後、終濃度が 100 μM となるように蒸留水で希釈することで 100 μM 水溶液を調製した。

測定の結果、Ac-チミジン **11** の UV-vis スペクトルでは約 300 nm 以上の波長領域では光吸収は認められなかった。一方で、ケージド Ac-チミジン **12** の UV-vis スペクトルでは 300 ~ 550 nm における波長領域に **11** では認められなかった光吸収が認められた。この結果から、ケージド Ac-チミジン **12** は波長 300 ~ 550 nm の光照射において、水溶液中で脱保護される可能性が高いと考えられた。そこで、まずは一般的にケージド化合物の光照射脱保護に利用されており、細胞内脱保護検討にも利用されている 365 nm の波長にて光照射脱保護反応を検討することとした。

まず、ケージド Ac-チミジン **12** への光照射により、光脱保護反応に伴う蛍光強度の増加が確認されるか検討した。光脱保護反応を実施する際に使用する溶媒は、従来のチオクロモン型光解離性保護基の脱保護反応で使用したメタノール (MeOH) と、1% DMSO 含有水溶液を選択した¹⁰。

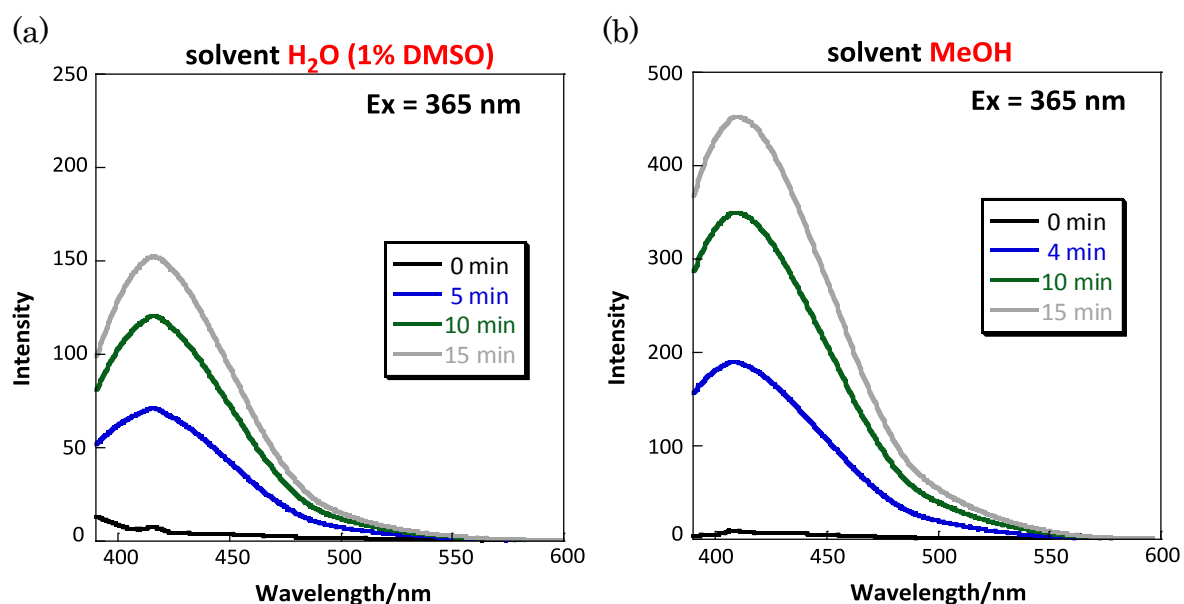


Figure 27. ケージド Ac-チミジン **12** の光照射脱保護反応に伴う蛍光スペクトル変化条件: 蛍光励起波長: 365 nm; 濃度: 100 μ M; 光源: 140 W, 365 nm ハンディタイプ UV ランプ; バンド幅 5 nm, 感度 Medium

a) 溶媒: 1% DMSO 含有水溶液; 最大蛍光波長: 416 nm

b) 溶媒: MeOH; 最大蛍光波長: 408 nm

ケージド Ac-チミジン **12** への光照射の結果、メタノール中及び水溶液中において、光照射時間依存的に蛍光強度が増大していくことが確認された (Figure 27)。この結果から、ケージド Ac-チミジン **12** に 365 nm の光を照射することで、光照射時間依存的に蛍光性化合物が副生している可能性が示唆された。また、水溶液中においても光反応が進行することを確認することができた。

次に、ケージド Ac-チミジン **12** への 365 nm の光照射後の溶液を逆相 HPLC により分析した (Figure 28)。移動相はアセトニトリル: H₂O = 50 : 50、カラムオープン温度は 23 °C に設定し、検出器は UV 検出器を用いて検出波長を 254 nm に設定した。移動相の流速を 0.2 mL / min に設定し、カラム長 150 mm、半径 (φ)4.6 mm の ODS カラムで分析を実施した。

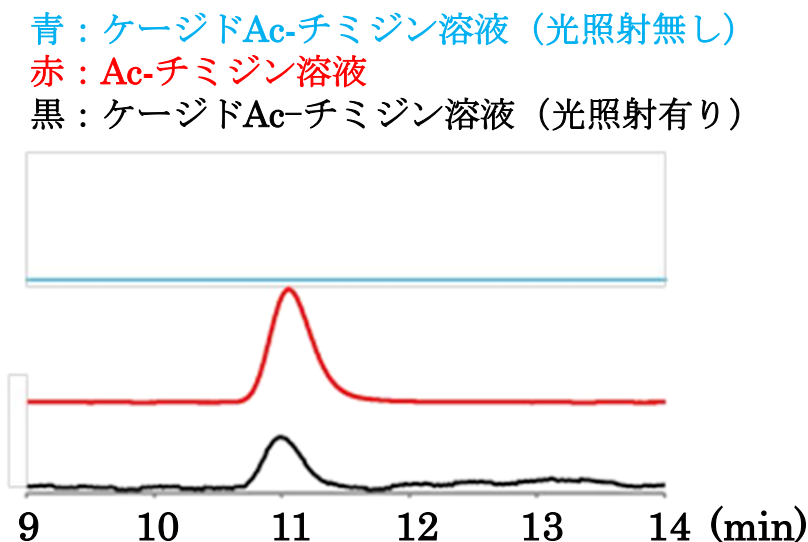


Figure 28. ケージド Ac-チミジン **12** への光照射による Ac-チミジンの再生確認 (HPLC)

HPLC 分析の結果、ケージド Ac-チミジン **12** への 365 nm 光照射後の溶液において、保持時間 (Retention time, RT) 11 min 付近に、Ac-チミジンのピークと同様のピークが観測された。一方で、光照射前のケージド Ac-チミジン溶液からは、保持時間 11 min 付近のピークは認められなかった。以上の結果から、ケージド Ac-チミジン **12** への光照射により Ac-チミジンが再生される可能性が示唆された。

一方で、本検討ではメタノール中におけるケージド Ac-チミジン **12** への光照射脱保護反応に伴い 408 nm を最大蛍光波長とする蛍光を観測したが、この最大蛍光波長は従来の研究で得られている蛍光性四環性化合物 **2** のメタノール中における最大蛍光波長 445 nm とは異なっている (Figure 27 b)。つまり、ケージド Ac-チミジン **12** への光照射脱保護反応により生成する蛍光性化合物は、従来の蛍光性四環性化合物 **2** とは異なる新規分子種である可能性が高い。そのため、第四項ではケージド Ac-チミジン **12** への光照射脱保護反応により生成する蛍光性分子種の単離、及びその分子構造の決定を実施することとした。

第四項 新規蛍光性分子種の単離と構造推定

ケージド Ac-チミジン **12** への光照射脱保護反応に伴い生成する、蛍光性分子種の単離を試みた。まずは、波長 365 nm の光を長時間照射することで、より多くの蛍光性分子種を取得可能か検討した。尚、溶媒はメタノールを使用した (Figure 29)。

ケージド Ac-チミジン **12** への長時間光照射の結果、光照射 15 分までは最大蛍光波

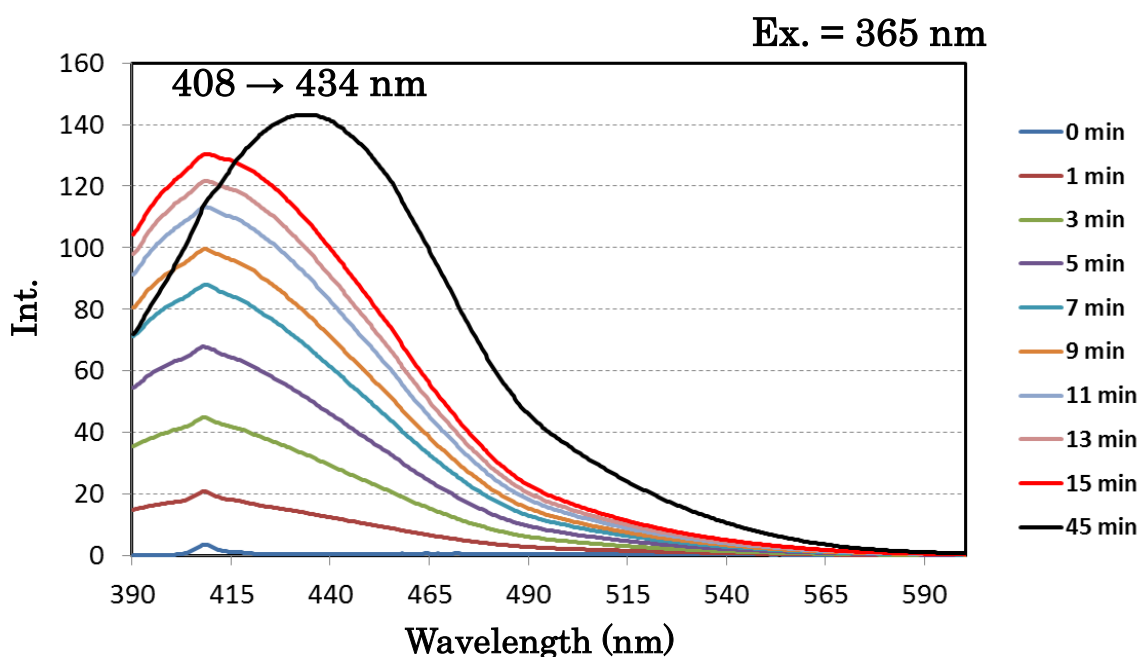


Figure 29. ケージド Ac-チミジン **12** への長時間光照射に伴う蛍光スペクトル変化条件: 蛍光励起波長: 365 nm; 濃度: 100 μ M; 光源: 140 W, 365 nm ハンディタイプ UV ランプ; 溶媒: MeOH; バンド幅 3 nm, 感度 Low

長を 408 nm とする蛍光強度が光照射時間依存的に増加することを確認した。しかし、光照射をさらに 30 分追加すると最大蛍光波長を 434 nm とする蛍光スペクトルの長波長シフトが観測された。この最大蛍光波長が 408 nm から 434 nm へとシフトした原因については、蛍光性分子種の分解及び、さらなる蛍光種の生成による可能性が考えられた。本検討では、最大蛍光波長 408 nm として得られる新規蛍光種の単離及び構造推定を目的としているため、光照射の途中段階で最大蛍光波長が 408 nm から 434 nm へとシフトしてしまう本条件では、最大蛍光波長 408 nm に由来する蛍光性分子種をより多く取得することは難しく、さらには解析系をより複雑にする懸念が考えられた。そのため、光脱保護時に照射する光の波長を 365 nm から 445 nm へと変更し、より長波長の光を長時間照射するアプローチへと変更した。

今回、445 nm の光照射を実施するための光源として、上海ドリームレーザー技術社製半導体レーザー（出力 30 mW, 445 nm）を採用した。まずは、本光源を用いて 100 μ M のケージド Ac-チミジン **12** へ 445 nm の光照射を行ない、各照射時間毎に蛍光スペクトルを測定した（Figure 30）。

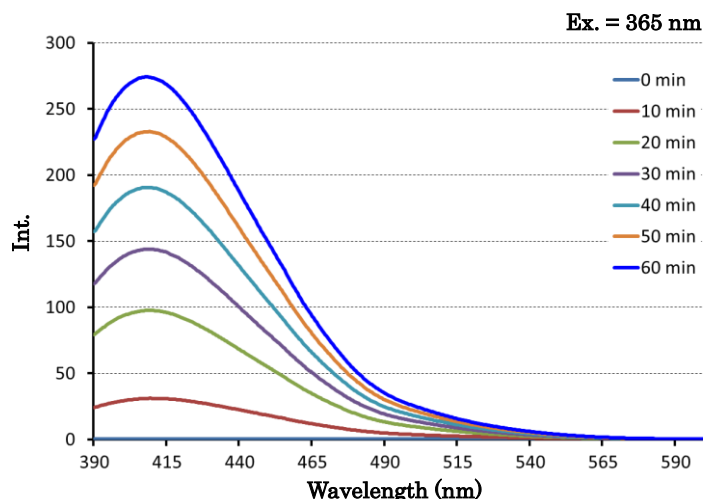


Figure. 30. ケージド Ac-チミジン **12** への長時間 445 nm 光照射に伴う蛍光スペクトル

条件: 励起波長: 365 nm; 濃度: 100 μ M; 光源: 30 mW, 445 nm 半導体レーザー; 溶媒: MeOH; 最大蛍光波長: 408 nm; 濃度: 100 μ M; バンド幅 3 nm, 感度 Medium

その結果、445 nm 光照射においても、365 nm 光照射により観測された最大蛍光波長 408 nm の蛍光スペクトルが得られた。さらに、445 nm の光照射では 60 分という長時間の光照射でも、光照射の途中段階で最大蛍光波長が 408 nm から 434 nm へと変化すること無く、光照射時間依存的に蛍光強度が増加することが判明した。

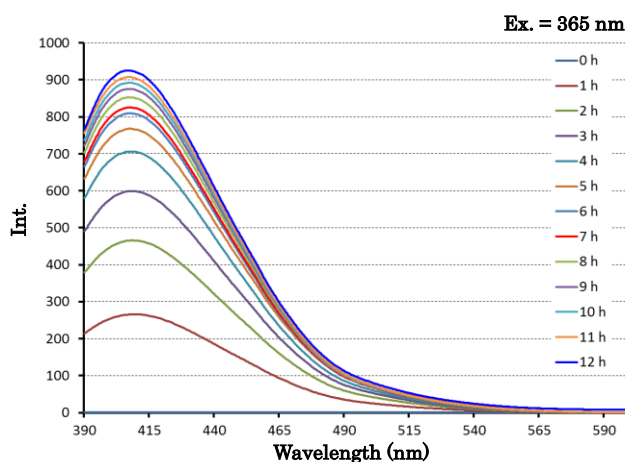


Figure 31. ケージド Ac-チミジン **12** への長時間 445 nm 光照射に伴う蛍光スペクトル

条件: 励起波長: 365 nm; 光源: 30 mW, 445 nm 半導体レーザー; 溶媒: メタノール; 最大蛍光波長: 408 nm; 濃度: 1 mM; バンド幅 3 nm, 感度 Low

初期検討では、100 μM のケージド Ac-チミジン **12** に対して検討したが、より多くの蛍光性分子種を取得するため、用いるケージド Ac-チミジン **12** の濃度を 10 倍増加して 1 mM とし、さらに 12 時間光照射した (Figure 31)。その結果、1 mM の高濃度条件下においても光照射時間依存的に蛍光強度が増加することを確認した。さらに、光照射を 12 時間実施しても光照射の途中段階で最大蛍光波長が 408 nm から 434 nm へと変化しないことが判明した。一方で、光照射時間 5 ~12 時間において、光照射時間に対する蛍光強度の増加率が著しく低下することが判明した。その原因として、多量に生成した蛍光性分子種による光反応の阻害、及び多量に生成した蛍光性分子種の自己消光による見かけ上の蛍光強度の低下が考えられた。本検討結果から、十分量の蛍光性分子種を得るために、メタノール中において 1 mM のケージド Ac-チミジン **12** に対して 445 nm の光を 12 時間照射する条件に決定した。

次に、逆相 HPLC を用いて蛍光性分子種の単離条件の検討を実施した。移動相はアセトニトリル: H_2O = 50 : 50、カラムオープン温度は 23 $^{\circ}\text{C}$ に設定し、検出器は UV 検出器を用いて検出波長を 333 nm に設定した。移動相の流速を 0.5 mL/min に設定し、カラム長 150 mm、半径 (ϕ)4.6 mm の ODS カラムで分析を実施した (Figure 32)。尚、全ての分析サンプルは HPLC 用アセトニトリルに溶解して分析に使用した。

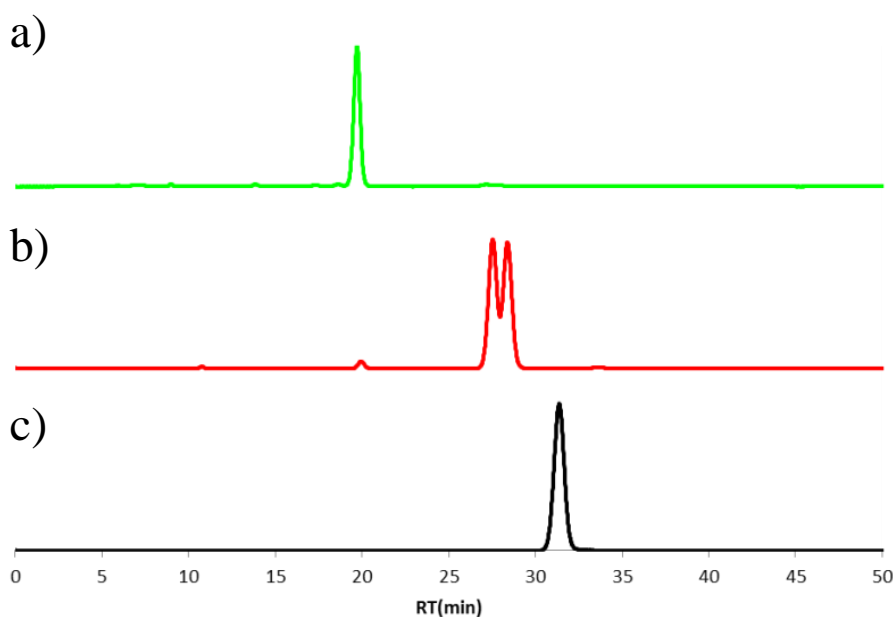


Figure 32. 各サンプルの HPLC 分析データ

(a) ケージド Ac-チミジン **12**, (b) 445 nm 光照射後のケージド Ac-チミジン **12**

(c) 蛍光性四環性化合物 **2**

HPLC 分析の結果、光照射前のケージド Ac-チミジン **12** では、RT 20 min 付近にケージド Ac-チミジン **12** 由来のピークが認められた (Figure 32a)。また、蛍光性四環性化合物 **2** では、RT 31 min 付近にピークが認められた (Figure 32c)。一方で、445 nm 光照射後のケージド Ac-チミジン **12** では、RT 20 min 付近にケージド Ac-チ

ミジン **12** 由来のピークが認められるものの、RT 28 min 付近に 2 本のピークが認められた (Figure 32b)。この時点で、この 2 本のピークが蛍光性分子種由来のピークである可能性が示唆されたため、RT 28 min 付近の 2 本のピークを分取し、蛍光スペクトルを測定した (Figure 33)。

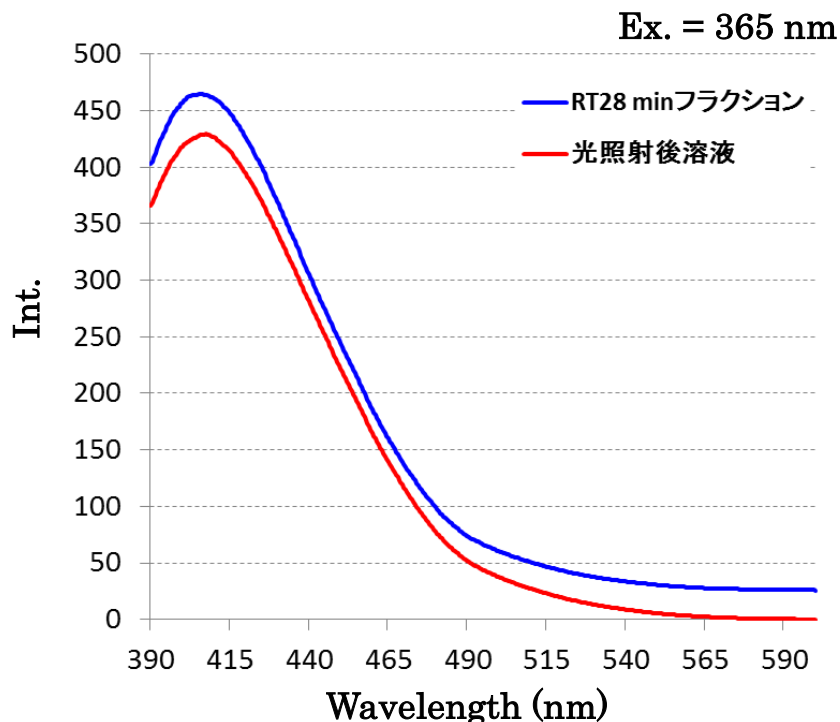


Figure 33. **12** への 445 nm 光照射後溶液 (クールド) 及び、HPLC 分取後の RT 28 min フラクションの蛍光スペクトル

溶媒: MeOH; 最大蛍光波長 (RT 28 min フラクション) : 406 nm,
最大蛍光波長 (光照射後溶液) : 408 nm

その結果、最大蛍光波長を 406 nm とする蛍光スペクトルが観測された。この結果から、RT 28 min 付近の 2 本のピークは蛍光性分子種由来のピークであると考えられた。また Figure 32 より、これら 2 本のピークは蛍光性四環性化合物 **2** 由来のピークとも異なる位置に観測されることから、ケージド Ac-チミジン **12** に対する光照射脱保護反応の結果生成する蛍光性分子種は、従来の蛍光性四環性化合物 **2** とは異なる分子であることが明らかとなった。

続いて、本光照射脱保護反応によって生成した蛍光性分子種の構造を解明するために、HPLC 分析により認められた 2 本のピークを分離し、各ピーク由来の分子について単離可能な条件を検討した。まず、Figure 32 (b) サンプルから、ケージド Ac-チミジン **12** を除くため、蛍光性分子種由来と推定している 2 本のピークの分取を実施した。分取条件は、移動相にアセトニトリル : H₂O = 50 : 50、UV 検出器の検出波長を 254 nm に設定した。移動相の流速を 10 mL / min に設定し、カラム長 250 mm、半径 (φ)10.0 mm の ODS カラムで分取を実施した (Figure 34)。

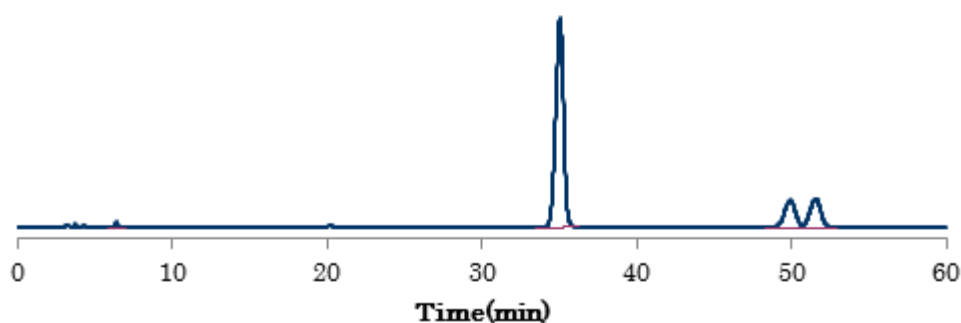


Figure 34. 445 nm 光照射後のケージド Ac-チミジン **12** の分取 HPLC データ

まず、RT 35 min 付近のピークを分取して ¹H-NMR を取得した結果、ケージド Ac-チミジン **12** であることを確認した。続いて、50 min 付近に観測された 2 本のピークを分取し、各ピーク由来の分子種について詳細に検討するため、これら 2 本のピークを分離するための条件検討を実施した。最初に、移動相の溶媒比率の検討を実施した。

アセトニトリルの比率を 40、39、38、37、36%へと徐々に下げて検討を行なった結果、アセトニトリルの比率を下げるに従って RT が長くなり、2 本のピークが徐々に分離していくことが判明した (Figure 35)。両ピークの分離条件としては、アセトニトリルと H₂O との混合比率が 36 : 64 の条件が最も良い条件であったが、RT は約 95 min であった。ここで、本条件を分取 HPLC 条件に変換すると、RT は約 180 min になることが予想された。そこで予備検討を実施したところ、本来は 180 min 付近でピークが確認されるはずが、当研究室で保有している分析用 HPLC 装置の都合上、RT 270 min 付近にピークが確認され、さらにピークがテーリングして検出が困難になることが判明した。そのため、ピークの分離能及び実験効率の 2 点を考慮した結果、アセトニトリルと H₂O との混合比率が 39 : 61 の条件 (Figure 35b) を最適条件として採用することとした。

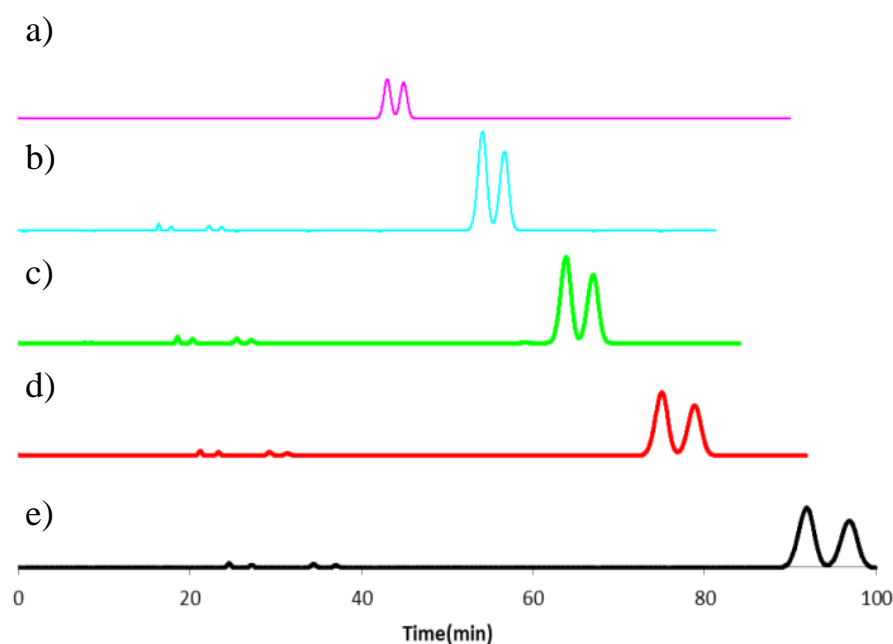


Figure 35. 蛍光性分子種由来と推測される 2 本のピークの分離条件検討
 流速; 1 mL/min, 検出波長; 333 nm

- (a) アセトニトリル : H₂O = 40 : 60
- (b) アセトニトリル : H₂O = 39 : 61
- (c) アセトニトリル : H₂O = 38 : 62
- (d) アセトニトリル : H₂O = 37 : 63
- (e) アセトニトリル : H₂O = 36 : 64

上記検討で決定した単離条件を用いて、実際に蛍光性分子種の単離に着手した。まず、1 mM のケージド Ac-チミジン 12 溶液 (溶媒はメタノール) に 445 nm (出力 30 mW) の半導体レーザーを 12 時間照射した光照射脱保護溶液を分取カラムに仕掛け、先の検討で決定した HPLC 条件にて蛍光性分子種の単離を行なった (Figure 36)。

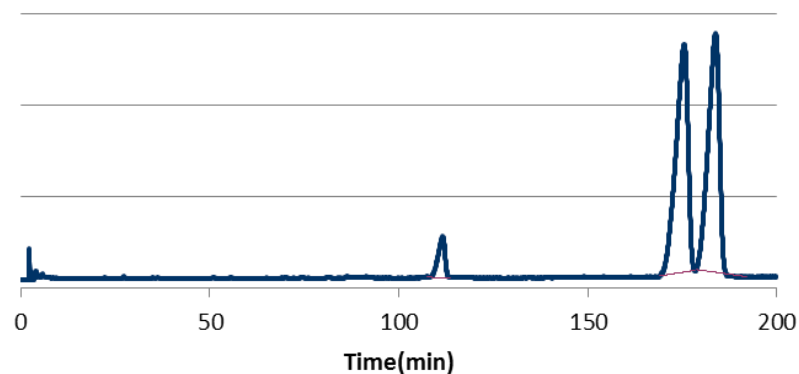


Figure 36. 445 nm 光照射後のケージド Ac-チミジン 12 の分取 HPLC データ
 移動相; アセトニトリル : H₂O = 39: 61, 流速; 10 mL/min, 検出波長; 333 nm

その結果、RT 110 min 付近にケージド Ac-チミジン **12** 由来のピークが観測された (本ピークがケージド Ac-チミジン **12** 由来であることは $^1\text{H-NMR}$ で確認済)。また、RT 170 min 付近に蛍光性分子種由来と推測される 2 本のピークが観測された。ここで、各ピーク由来の分子種を厳密に分取する目的で、170 min 付近の 2 本のピーク由来サンプルについて、1 mL/min の流速で 30 秒ごとにフラクションを分取した (Figure 37)。

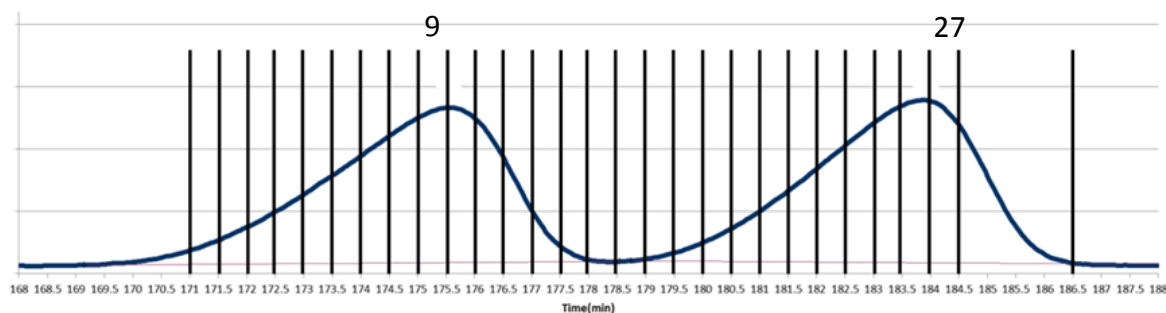


Figure 37. 分取した各フラクションの拡大図

続いて、上記で分取した各フラクションのうち、フラクション No.9 及び 27 を分析用 HPLC にて再解析した (Figure 38)。

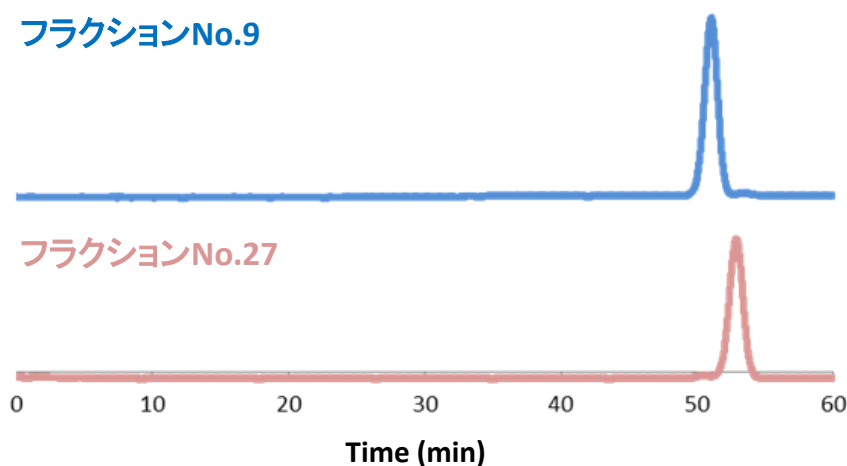


Figure 38. フラクション No.9, 27 の HPLC データ

移動相; アセトニトリル : H_2O = 39 : 61, 流速; 1 mL/min, 検出波長; 333 nm

分析用 HPLC による再解析の結果、各フラクション由来サンプルは、各々が単一のピークを示すことが判明した (Figure 38)。この結果を受けてフラクション No.9 及び 27 について、 $^1\text{H-NMR}$ および ESIMS を測定した (Figure 39)。尚、便宜的にフラクション No.9 を蛍光性分子種 **A** (Fluorescent A)、No.27 を蛍光性分子種 **B** (Fluorescent B) と命名した。

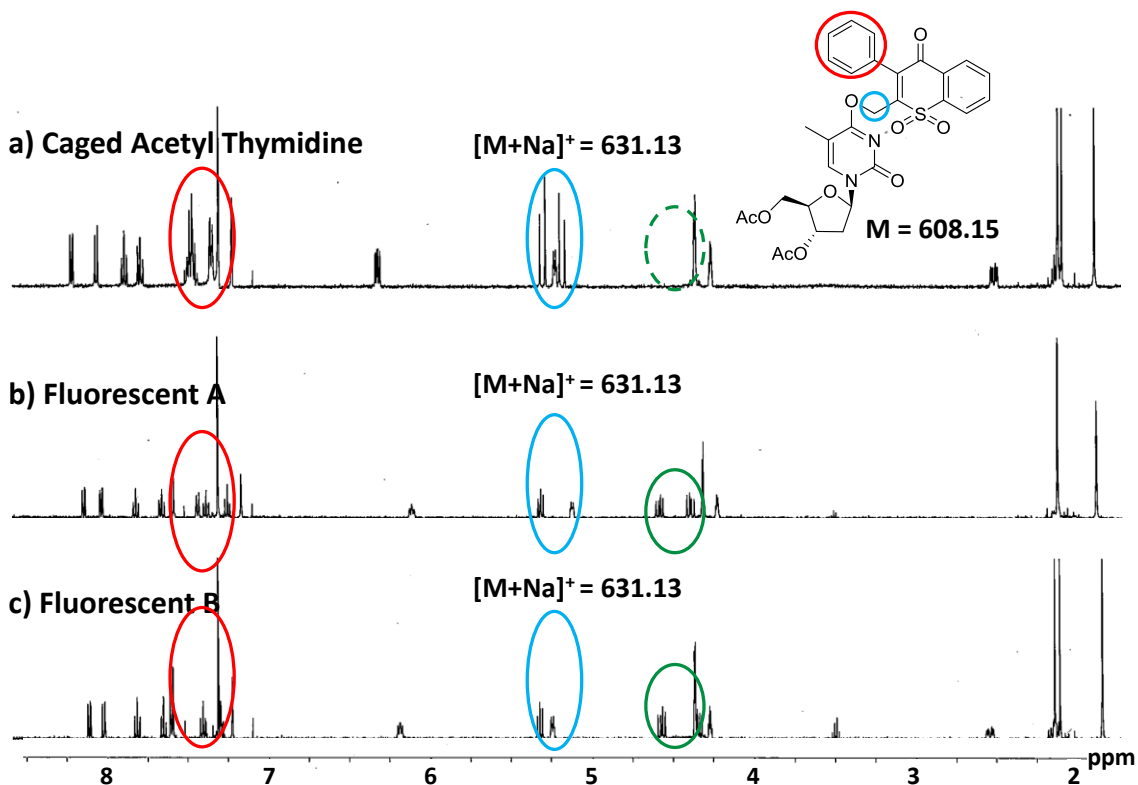


Figure 39. 各サンプルの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び ESIMS 結果
 (a) ケージド Ac-チミジン, (b) 蛍光性分子種 A, (c) 蛍光性分子種 B

各サンプルの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル測定の結果、ケージド Ac-チミジンと比較して蛍光性分子種 A 及び B のスペクトルでは種々の相違点が認められたものの、そのスペクトルは酷似していた。また、三者においてプロトン数及びカーボン数が同一（プロトン数：28；カーボン数：30）であることを確認した（実験項参照）。相違点としては、A 及び B のスペクトルではケージド Ac-チミジンで認められていた Ph 基由来の 7.27-7.50 ppm 付近のピーク（赤丸）が消失している点、及び 5.12、5.25 ppm 付近に観測されているメチレン鎖由来のピーク（青丸）が消失し、新たなピークが認められた点があげられる。さらに、ケージド Ac-チミジンでは認められなかった 4.50 ppm 付近のピークが A 及び B では観測された。一方で ESIMS の結果、A 及び B において 631 m/z が観測された。この値はケージド Ac-チミジン (608 m/z) の Na^+ 付加により認められる値と一致する。ここまでの結果から、蛍光性分子種 A, B は Ac-チミジン及びチオクロモン骨格を有することが推測され、Figure 40 に示す構造が推定構造として考えられる。

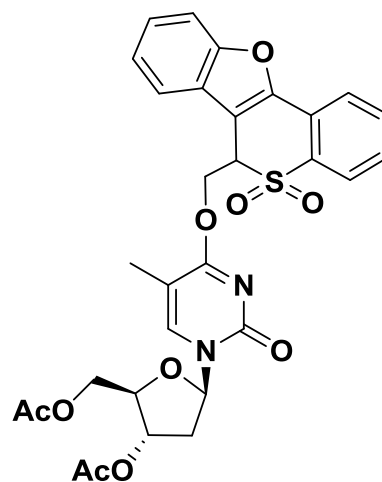


Figure 40. 蛍光種の推定構造

次に、蛍光性分子種 **A** 及び **B** について、DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) を測定した。その結果、**A** では、解析可能なデータを得ることが出来なかったが、**B** については明確なデータを得ることができた (Figure 41)。この結果から、**B** はメチレン基を三つ有する (δ : 63.9, 39.7, 37.8 の三つのピークに該当) ことが判明した。尚、先ほど Figure 40 に示した蛍光種の推定構造中にも、メチレン基が三つ含まれている。

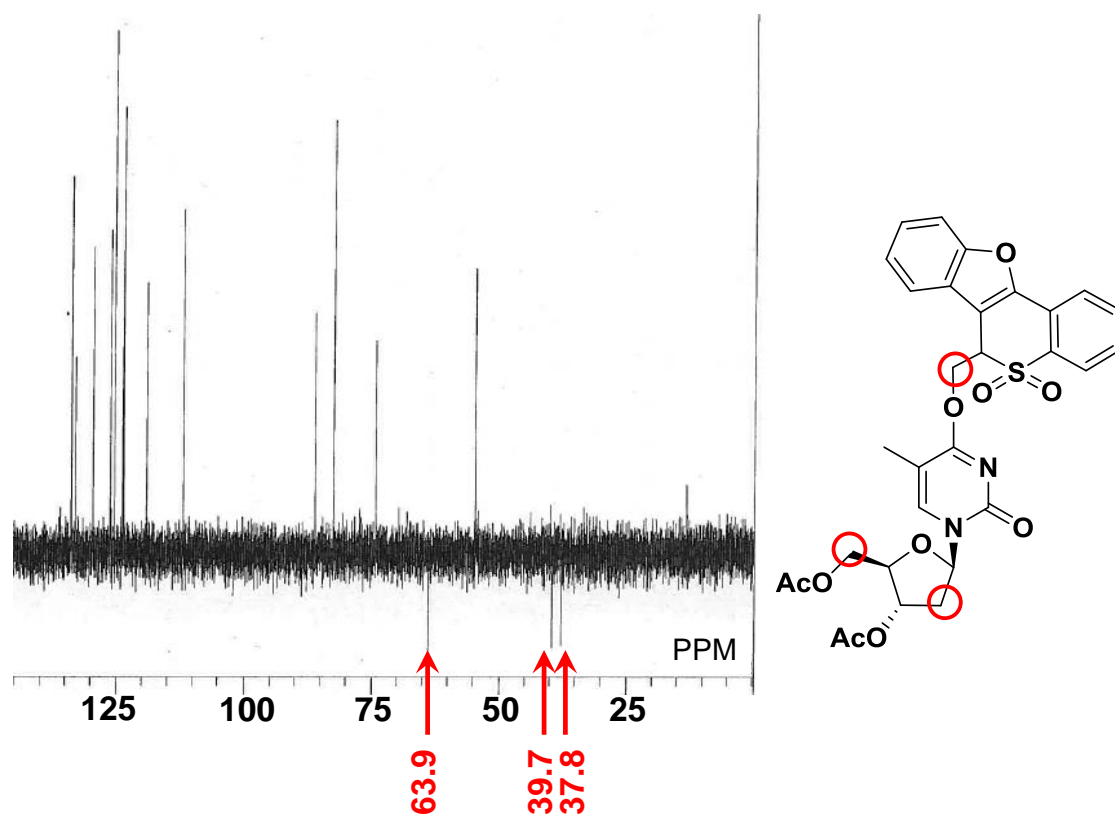


Figure 41. 蛍光性分子種 **B** の DEPT 135 スペクトル (右図は **B** の推定構造)

続いて、蛍光性分子種 **A**, **B** の二次元 NMR を測定した。まず、**B** の HMQC (Hetero-nuclear Multiple Quantum Coherence) スペクトルから、DEPT 135 の結果で得られた三つのメチレン基について帰属すると、39.7ppm のカーボンがリンカーのメチレン鎖の炭素、37.8 ppm のカーボンが糖のアノマー位の隣の炭素、残りの 63.9 ppm のカーボンが糖の 5'位のメチレン基の炭素である事が判明した (Figure 42)。HMQC 及び DEPT から得られた情報を、**B** の推定構造に反映した (Figure 43)。

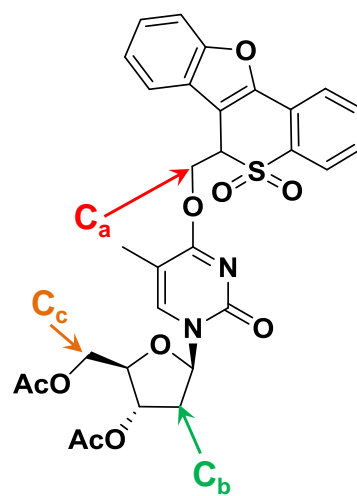


Figure 43. **B** のメチレン基の帰属

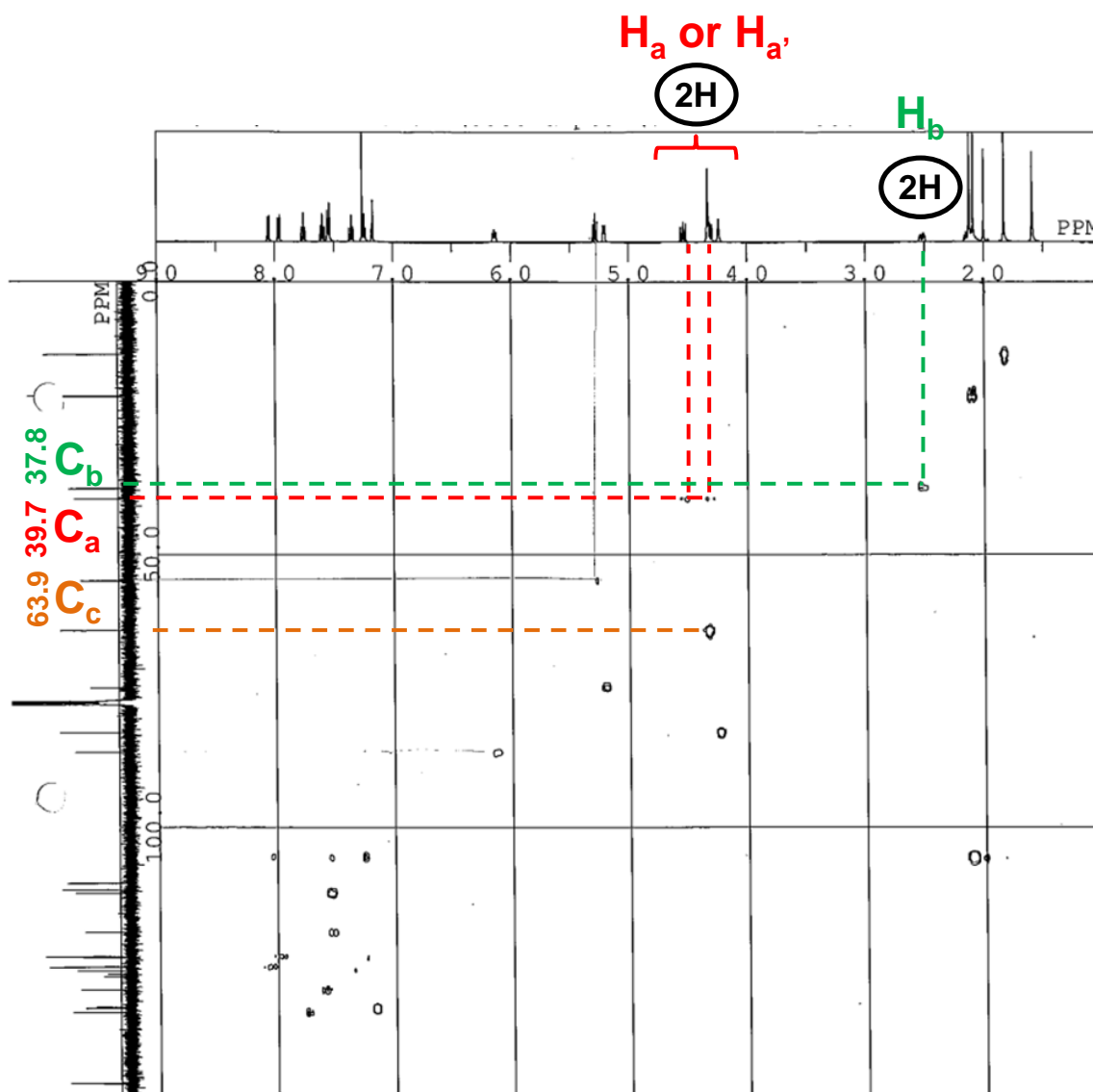


Figure 42. 蛍光性分子種 **B** の HMQC スペクトル
各炭素 (C_a , C_b) に結合している水素を H_a, H_a' , H_b と表記

次に、**B** の COSY (COrrelation SpectroscopY) スペクトルを解析した。4.5ppm 付近の二つのプロトン (リンカーのメチレン鎖に結合しているプロトン) に着目して COSY スペクトルを読み解くと、リンカーのメチレン鎖のプロトンと相互作用する 1H 分のプロトンを確認した (Figure 44)。この結果を考慮すると、この 1H プロトンは Figure 45 に示した **B** の推定構造中のリンカーのメチレン鎖に結合しているプロトン (H_a , H_a') の隣のプロトン (H_d) であると考えられることができる。つまり、蛍光性分子種 **B** は、リンカーのメチレン鎖の隣に新たにメチン基を有することが明らかとなった。このメチン基は、ケージド Ac-チミジンには存在しなかったものである。

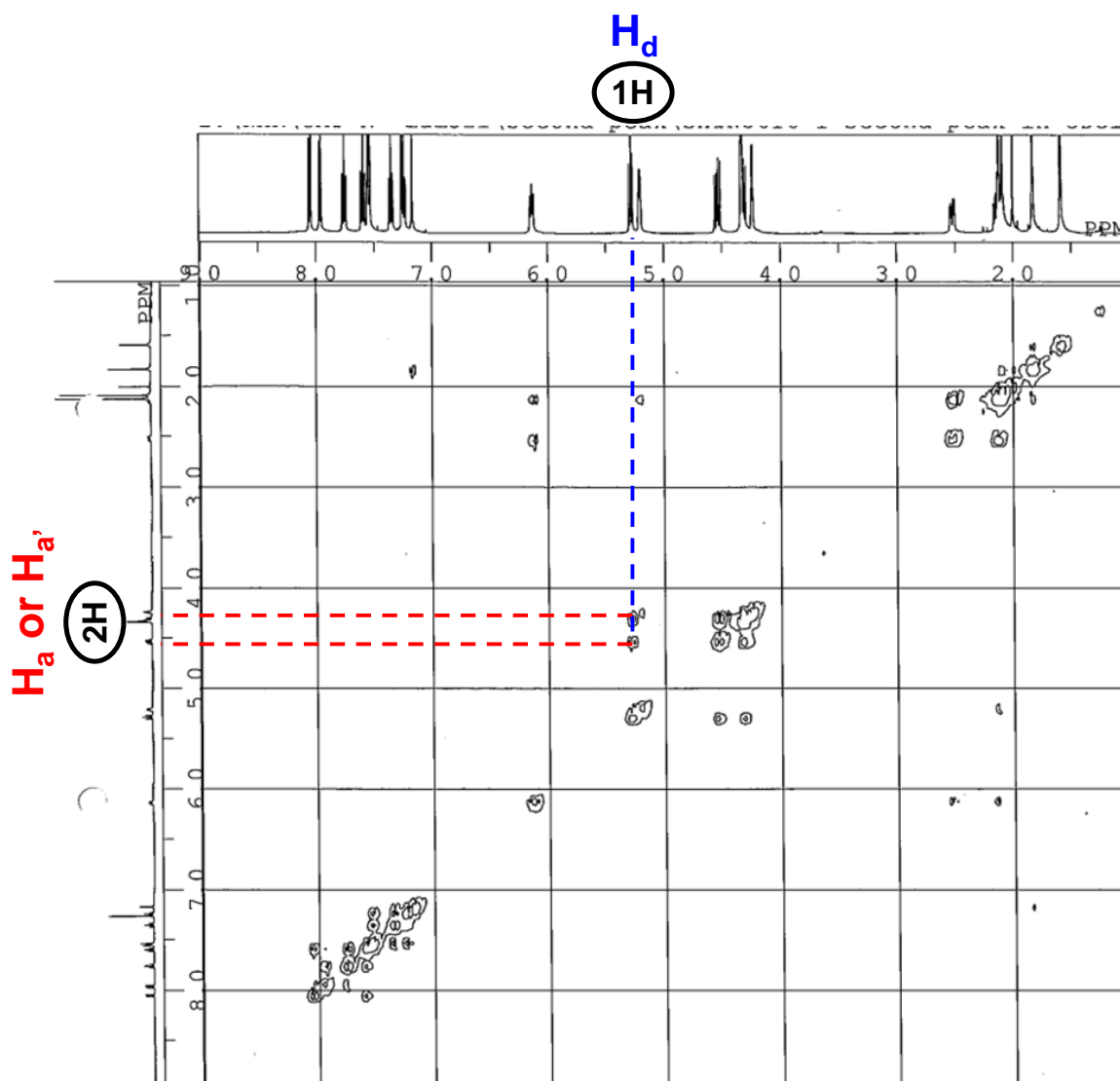


Figure 44. 蛍光性分子種 **B** の COSY スペクトル

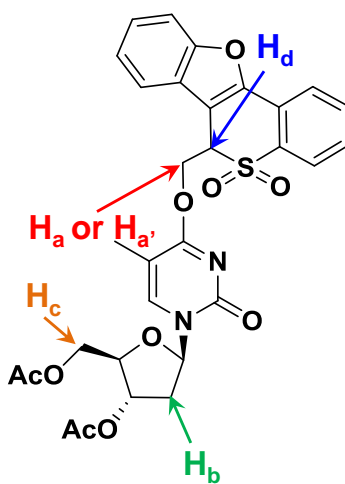


Figure 45. **B** の各プロトンの帰属

また、蛍光性分子種 **A**, **B** の HMQC 及び COSY スペクトルが酷似していること (Figure 46, 47)、及び **B** の推定構造中の H_a プロトンの付け根の炭素が四置換炭素となり、キラリティーを有する事から、**A** と **B** はジアステレオマーの関係にあることが推測された。尚、**A** の COSY スペクトルでも、リンカーのメチレン鎖の隣に新たにメチン基を有することが確認できる (Figure 47)。

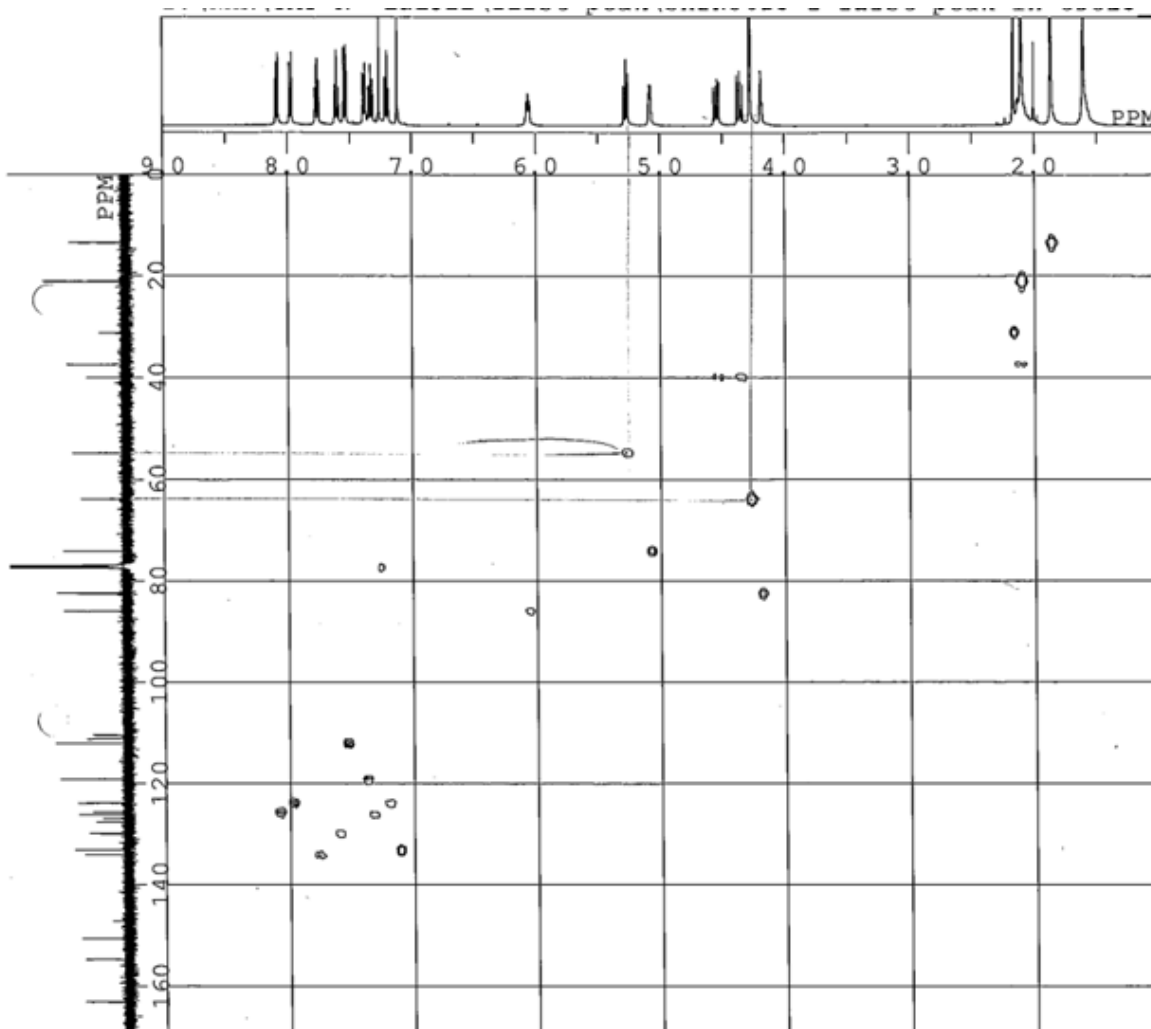


Figure 46. 蛍光性分子種 **A** の HMQC スペクトル

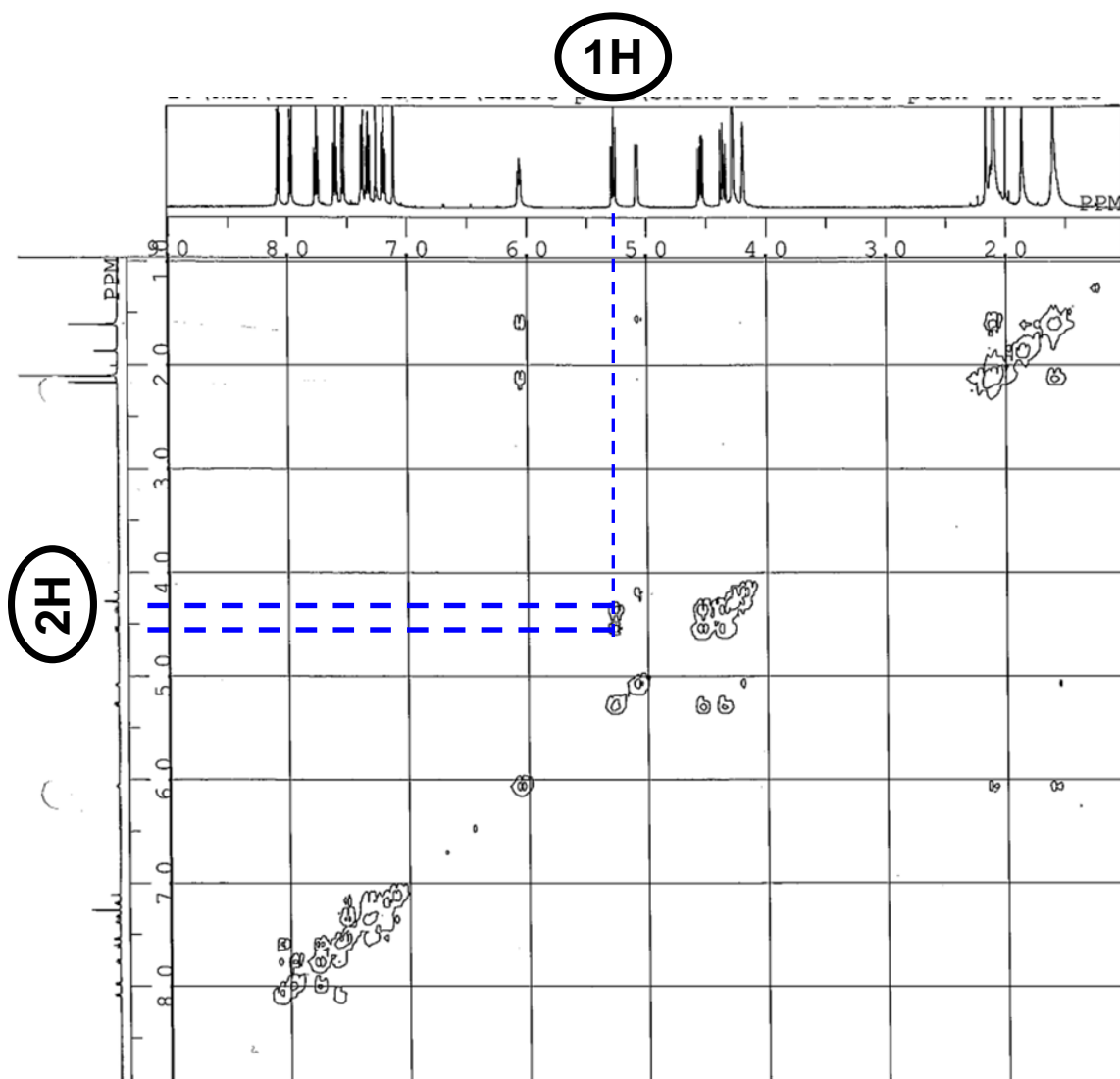
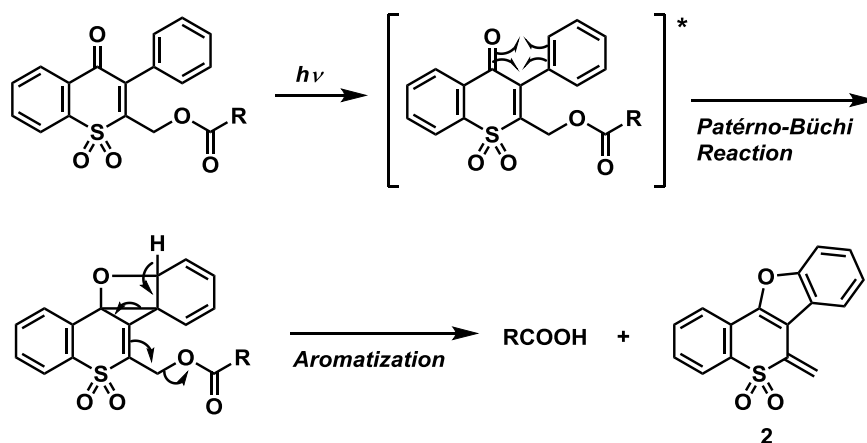


Figure 47. 蛍光性分子種 A の COSY スペクトル

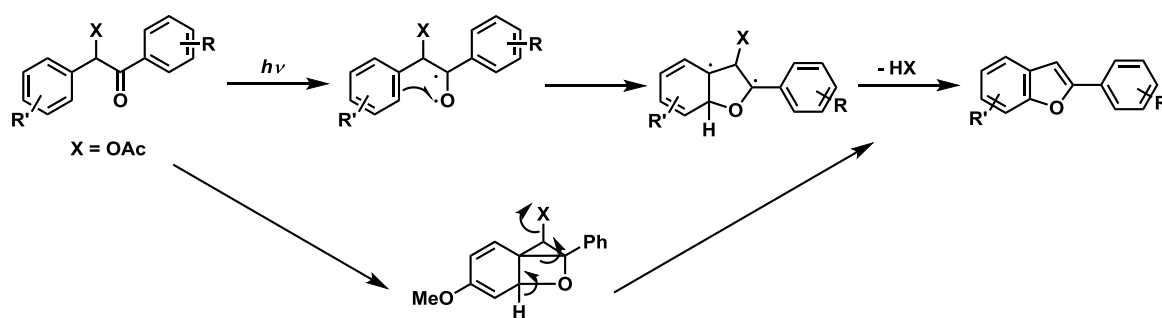
2H プロトンは蛍光性分子種推定構造中のリンカーのメチレン鎖プロトン、
 1H プロトンはリンカーのメチレン鎖の隣メチン基プロトンに該当

ここで、光反応によりチオクロモン型光解離性保護基から蛍光性四環性化合物が生成する際のメカニズムとして、以下の Scheme 10 に示す推定反応機構が考えられている¹⁰。



Scheme 10. 蛍光性四環性化合物 **2** が生成する際の推定反応機構

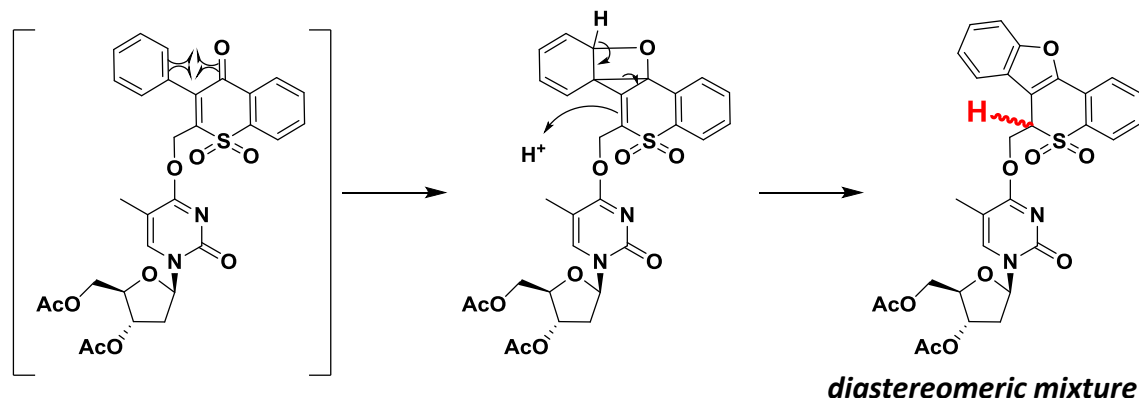
Scheme 10 では、エステル結合を介して本保護基を導入した場合を例に、光照射による蛍光性四環性化合物の生成メカニズムを示した。まず、光照射により励起状態を経た後、続いてエノンのカルボニルとフェニル基の二重結合が Paterno-Büchi 反応によりオキセタン骨格を構築する。最後に芳香族化を駆動力に歪んだオキセタン骨格が開環し、新たな環骨格を構築した結果として四環性化合物 **2** が生成すると同時にカルボン酸が放出される。Scheme 10 で示した反応機構は、光解離性保護基として古くから知られている Benzoin の光脱保護メカニズム (Scheme 11) と類似している¹¹。



Scheme 11. Benzoin 誘導体の光脱保護メカニズム

現在までのところ、正確な Benzoin の光脱保護メカニズムについては賛否両論あるが、Scheme 11 で示した二つの反応機構が提案されている¹¹。Benzoin の光脱保護メカニズムとして可能性の高い二つの反応機構のうち Scheme 11 下段の反応機構では、光照射により励起状態を経た後、ケトンのカルボニルとフェニル基の二重結合が Paterno-Büchi 反応によりオキセタン骨格を構築する。その後、芳香族化を駆動力に歪んだオキセタン骨格が開環し、新たな環骨格を構築した結果として benzofuran が生成すると同時に酢酸が放出される。この反応機構は、Scheme 10 で示した蛍光性四

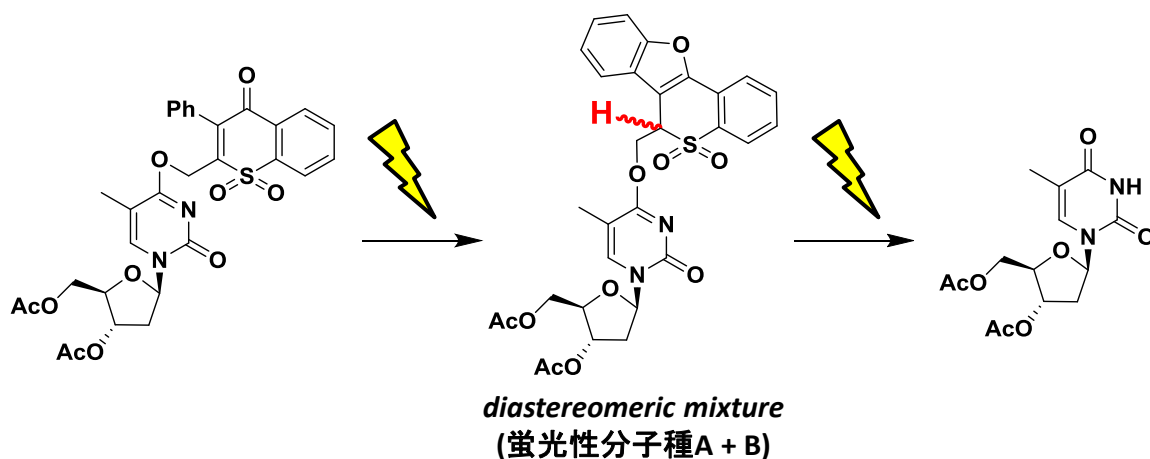
環性化合物 **2** が生成する際の推定反応機構と類似している。これら既報の反応機構及びケージド Ac-チミジンの光照射脱保護検討から得られた知見に基づくと、以下に示す反応機構により光反応が進行し、蛍光性分子種 **A**, **B** が生成したと考えられる (Scheme 12)。



Scheme 12. ケージド Ac-チミジンへの光照射による推定反応機構

まず、光照射により励起状態を経た後、続いてエノンのカルボニルとフェニル基の二重結合が Paterno-Büchi 反応によりオキセタン骨格を構築する。その後、通常はオキセタン骨格が開環して新たな環骨格を構築した結果、四環性化合物が生成するものの、本基質では分子内から切断されることなく光脱保護反応の中間体としてプロトンが付加した構造体が生成している可能性が考えられる。新たにプロトンが付加した炭素原子は立体中心を有することになり、さらにチミジン分子内の糖を形成する炭素原子は、複数の立体中心を有していることから、Scheme 12 に示した推定中間体として、二種類のジアステレオマーが生成している可能性が考えられた。また、このプロトンの付加については、構造的に分子の上側及び下側から付加できる確率がほぼ等しいと考えられるため、二種類のジアステレオマーがほぼ等しい割合で生成している可能性が高い。この考察は、先の HPLC 分析により、蛍光性分子種 **A** 及び **B** と考えられるピークの高さがほぼ等しく得られている点からも支持される。以上をまとめると、蛍光性分子種 **A** 及び **B** は Ac-チミジン及びチオクロモン骨格由来の構造を有しており、両者の構造が酷似している可能性が示唆されたことから、この二種類のジアステレオマーが蛍光性分子種 **A** 及び **B** である可能性が高いと考えられた。

一方、先の検討によりケージド Ac-チミジンへの光照射で、Ac-チミジンが再生されることも確認している。これらの一見矛盾する結果を説明するため、著者は次のような仮説を立てるに至った (Scheme 13)。



Scheme 13. ケージド Ac-チミジン **12** の推定光脱保護反応機構

まず、ケージド Ac-チミジンへの光照射により、蛍光性分子種 **A** 及び **B** へと光異性化反応により変換される。続いて、蛍光性分子種 **A** 及び **B** が光照射を受けることで、さらなる光反応が進行した結果、Ac-チミジンが再生されると考えた。この仮説を検証するため、単離した蛍光性分子種 **A**、**B** の混合溶液に対して出力 300 W で 330 nm の光照射を実施し、Ac-チミジンの生成が認められるか検証した。もし著者の仮説が正しければ、蛍光性分子種 **A**、**B** 由来のサンプルから、Ac-チミジンの生成が確認できると考えた。MeOH 中に溶解させた蛍光性分子種 **A**、**B** の混合溶液に対して、出力 300 W で 330 nm の光を 10、20、30、60、90 min の各時間照射し、各照射時間に対するサンプルを HPLC にて分析した (Figure 48)。

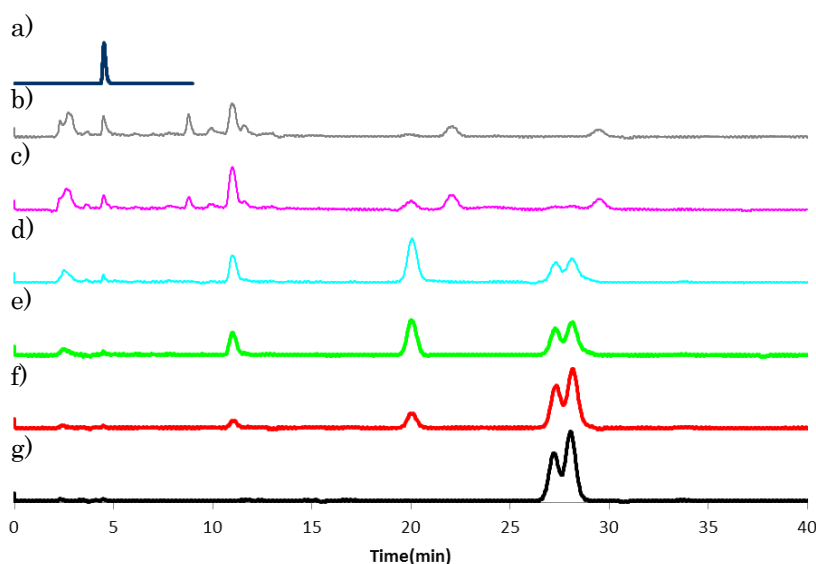


Figure 48. 蛍光性分子種 **A**、**B** への光照射後サンプルの HPLC 分析

a) Ac-チミジン, b) 90 min, c) 60 min, d) 30 min,
e) 20 min, f) 10 min, g) 0 min

流速; 0.5 mL/min, 検出波長; 333 nm, 移動相: アセトニトリル: H₂O = 50 : 50

HPLC 分析の結果、RT 28 min 付近の蛍光性分子種 **A** 及び **B** 由来の二本のピークが、光照射時間依存的に減少すると同時に、RT 4 min 付近に検出される Ac-チミジン由来のピークが光照射時間依存的に増加することを確認した。尚、光照射 90 min 後のサンプル (Figure 48b) を精密質量分析 (ESI 法) 及び $^1\text{H-NMR}$ で解析した結果から、RT 4 min 付近に検出されるピークは Ac-チミジンである事が確認された。

以上、本仮説を支持する結果が得られたことから、Scheme 13 に示したようにケージド Ac-チミジンへの光照射により、一度反応中間体として蛍光性分子種 **A**, **B** の生成過程を経た後に、さらなる光反応が進行した結果として Ac-チミジンが再生していることが判明した。

第三節 新規ケージドアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) への展開

第一項 機能性 ASO の選定

第二節において、ケージド Ac-チミジン **12** の合成及び光照射脱保護検討を実施した結果、**12** を新規ケージド核酸として利用可能であることが示唆された。本章の主な目的は、ケージドチミジンを一本鎖のオリゴ核酸であるアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) に組み込むことで、光照射により機能制御が可能なケージド ASO を開発することである。そのため、本目的を達成するためには、ケージドチミジンを導入すべき機能性 ASO を検討する必要がある。ここで著者は、第一章ケージドルシフェリンの検討で利用したルシフェラーゼ発現細胞を用いたルシフェリン-ルシフェラーゼ評価系に着目した。つまり、ホタルルシフェラーゼ mRNA に対する機能性 ASO を取得することができれば、ルシフェラーゼ発現細胞を利用したケージド ASO の *in vitro* 評価系を構築することが可能となる。また現状として、本来 4 種類ある DNA のうち、チミジン (T) に対するケージド核酸の合成に成功している。そのため、ホタルルシフェラーゼ mRNA に対する機能性 ASO の配列内に、複数個のチミジン塩基が導入されている ASO 配列が望ましい。一般的に、一本鎖のオリゴ核酸同士が二重鎖を形成する際に、塩基同士のミスマッチが内側に存在する場合の方が、外側に存在するよりも二重鎖形成を不安定化することが知られている¹²。この知見を利用すると、機能性 ASO の配列内に複数個のケージドチミジンを導入すると、相補鎖とのミスマッチが複数部位にわたり存在することになり、ケージド ASO として一時的に機能性 ASO の活性を抑制することが可能となる。一方で、機能性 ASO の 5'末端にケージドチミジンを有する配列も候補としては望ましいと考えられる。なぜなら、固相合成法によるオリゴ核酸合成において、人工的に合成した核酸塩基を導入する場合、オリゴ核酸の 5'末端に導入する手法が最もハードルが低いからである。オリゴ核酸の 5'末端に一塩基ミスマッチを有するのみで、ASO の機能低下が生じることが達成できれば、ケージド ASO に展開する有用なビルディングブロックになりえると言える。

以上を考慮して文献調査を実施した結果、Figure 49 に示すホタルルシフェラーゼ mRNA に対する機能性 ASO 配列を検討候補とすることにした¹³。

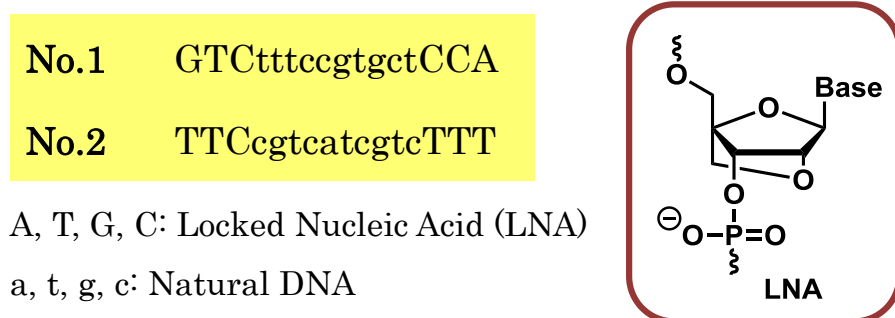


Figure 49. ホタルルシフェラーゼ mRNA に対する機能性 ASO 配列

ここで、No.1 及び No.2 の両配列は、ASO としての活性を高めるために、配列内の 5'末端側の 3 塩基及び 3'末端側の 3 塩基に、Locked Nucleic Acid (LNA) と呼ばれる人工核酸を導入している (Figure 49)¹³。この LNA は、DNA の糖部位の 2'-4' 部位を意図的にリンカーで繋ぐことで、本来 S 型及び N 型の二種類のコンホメーションを取り得る糖のコンホメーションを、強制的に N 型に固定している。一般的に、DNA-DNA 二重鎖は B 型らせん構造を形成し、RNA-RNA 二重鎖は A 型らせん構造を形成することが知られている。そのため、ASO のように、標的が RNA 鎖の場合、ハイブリダイゼーションさせる核酸の立体配座を A 型らせん構造中の状態に「あらかじめ固定化」しておくことで、強いハイブリダイゼーション能が獲得できる。A 型らせん構造中の糖部位のコンホメーションは N 型立体配座であることから、あらかじめ糖部位が N 型立体配座に固定された LNA は、RNA に対して強い結合能を示すことになる。このようなコンセプトのもと、ASO の活性を向上させる目的で、二つのモデル配列は計 6 個の LNA を導入されていることが報告されている^{13,14}。

文献では、この二種類の機能性 ASO が、nM オーダーの低濃度域で高いノックダウン (Knockdown, KD) 活性を示していた¹³。この KD 活性の再現性を検証するため、著者はルシフェラーゼ発現細胞を用いて両 ASO の *in vitro* KD 活性を評価した。

まず、アッセイ前日に 96well ホワイトプレートにルシフェラーゼ発現細胞

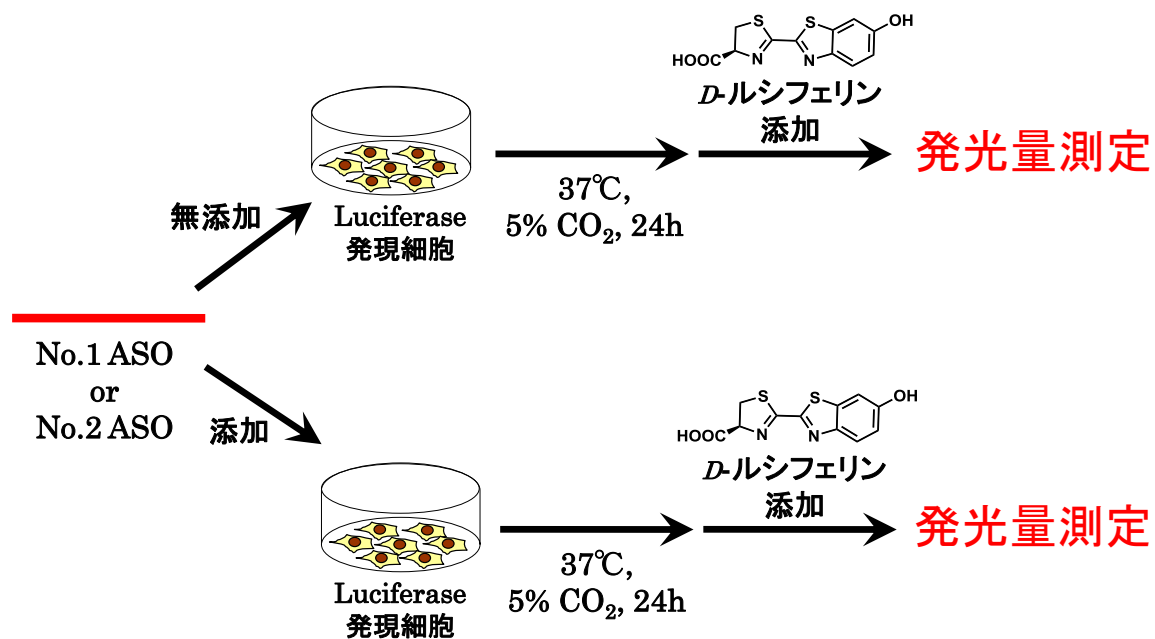


Figure 50. No.1 及び No.2 ASO の *in vitro* KD 活性評価

Luc-RERF 細胞を 4000 cells/well で播種した。翌日、終濃度が 5, 10 nM となるように各 ASO をリポフェクションにより細胞に導入し、5% CO₂、37 °C 条件下で 24 時間インキュベートした。24 時間後、細胞培養液中に D-ルシフェリンを添加 (実験項を参照) し、室温にて 10 分間インキュベートした後にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果生じるオキシルシフェリンの発光をルミノメーターにより測定した (Figure 50)。その結果、リポフェクション試薬のみ (Mock) 及び、ランダム配列

(Negative Control, Neg. Cont.) を導入したサンプル群では、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果生じるオキシルシフェリンの強い発光が認められた (約 160 万)。一方で、No.1 及び No.2 を導入した群では、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果生じるオキシルシフェリンの発光が強く抑制されていることを確認した (約 30 万)。本検討より、両配列ともに nM オーダーの低濃度域で高い KD 活性を示すことを確認した (Figure 51)。

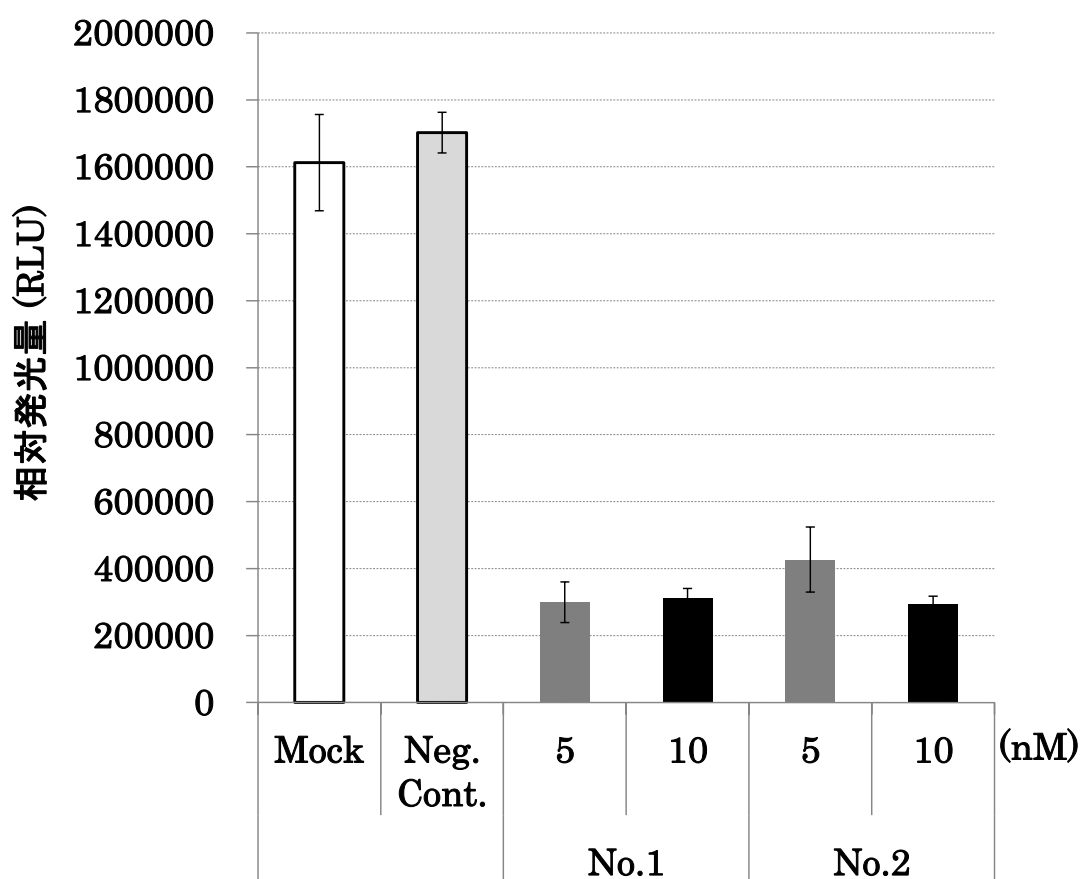


Figure 51. No.1 及び No.2 ASO の *in vitro* KD 活性評価結果

以上の検討結果から、ホタルルシフェラーゼ mRNA の発現を抑制する機能性 ASO として両者が有効であることを著者自身の評価系でも確認することができた。

第二項 オリゴ核酸合成へ向けた分子変換：ホスホロアミダイト体合成

第一項において、ケージドチミジンの導入先としての機能性 ASO の選定が完了した。そのため第二項では、オリゴ核酸へのケージドチミジンの導入について検討した。一般的に、オリゴ核酸は固相合成法により合成される (Figure 52)¹⁵。

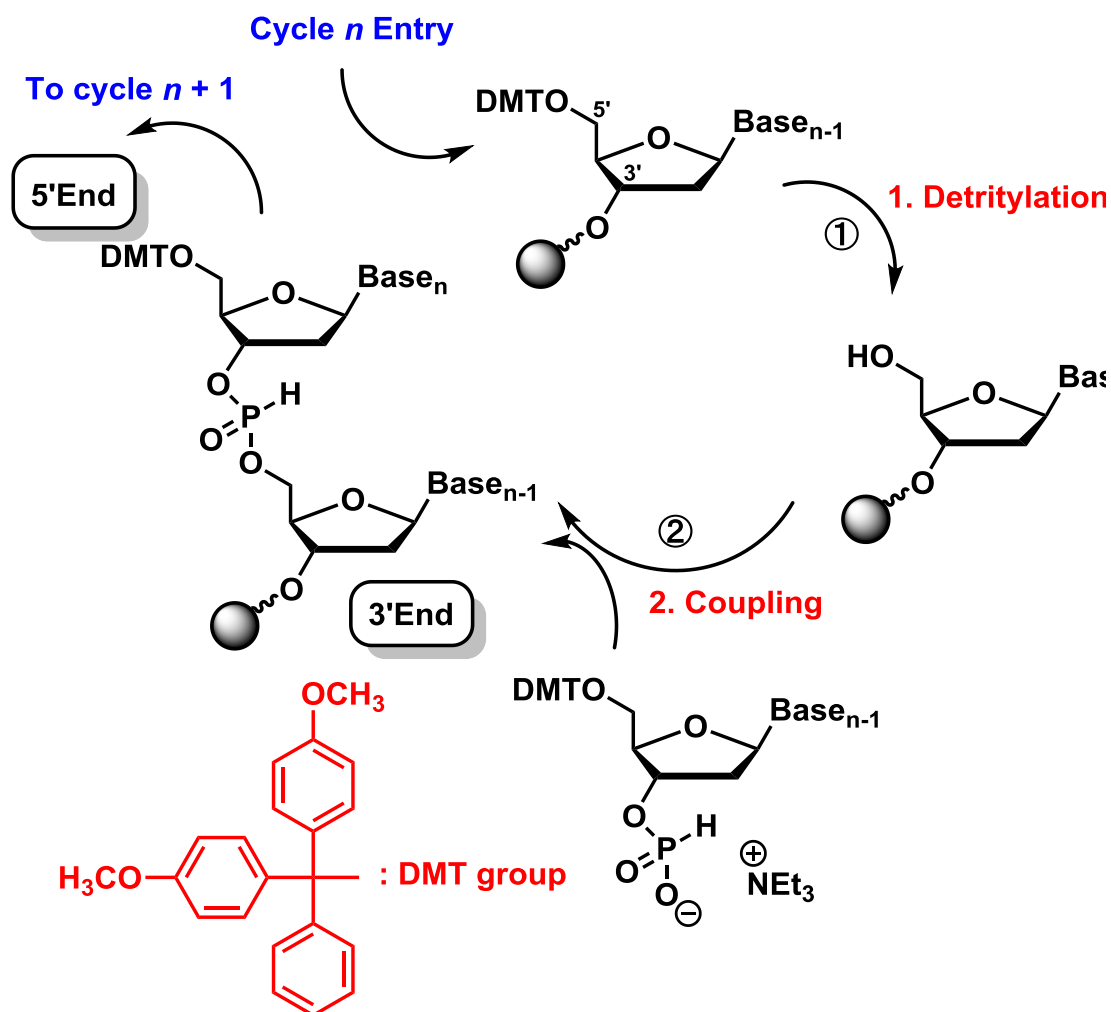


Figure 52. 固相合成法によるオリゴ核酸合成

固相合成法では、あらかじめオリゴ核酸の 3'末端となるべき核酸塩基を CPG 樹脂に担持しておく。その後、ステップ①で 3%トリフルオロ酢酸を使用して、糖の 5'位ヒドロキシル基を保護しているジメトキシトリチル基(Dimethoxytrityl, DMT group)を脱保護し、糖の 5'位ヒドロキシル基を露出させる。続いて、ステップ②で新たに結合させたい DNA モノマーを反応系に加え、先の 5'位ヒドロキシル基にリン酸結合を介して DNA モノマーを結合させる。このステップを複数回繰り返すことで、3'末端側から 5'末端側へと核酸を伸長させていくことでオリゴ核酸を合成する。オリゴ核酸の伸長を完了させた後、塩基性条件下に曝すことでオリゴ核酸を樹脂から切り出し、

一連のオリゴ核酸合成が完了する。一般的な固相合成法では、dA, dT, dG, dC の各 DNA 塩基をホスホロアミダイト体と呼ばれるビルディングブロック型に変換したモノマーを使用する (Figure 53)¹⁵。

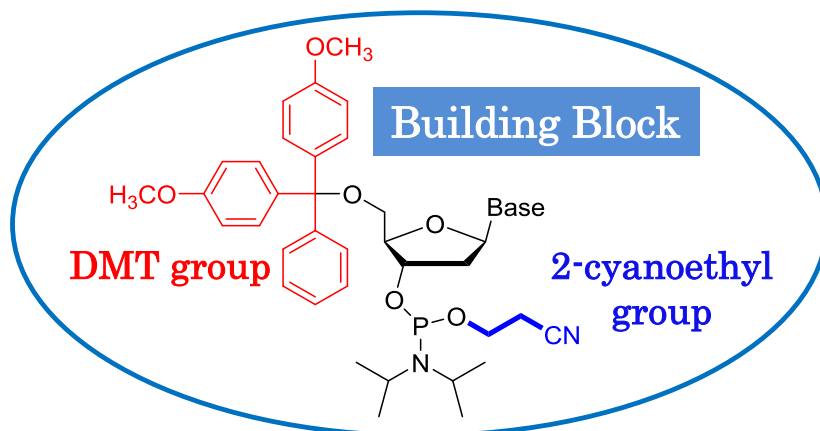


Figure 53. オリゴ核酸合成に利用する DNA モノマーの構造

これら DNA モノマーを 3'末端から 5'末端側へと一つ一つ繋げていくことにより、オリゴ核酸は合成される。ここで、第二節において合成したケージド Ac-チミジン **12** は、3', 5'ともにアセチル基で保護されているため、このままの分子構造では通常の固相合成法の DNA モノマーとして使用することができない。そのため、ケージド Ac-チミジン **12** をホスホロアミダイト体へと分子変換することにより、固相合成法へと使用可能なビルディングブロックの合成を試みた。ここで、Figure 54 に示した一般的に利用されている DNA モノマーへの変換を試みたが、目的のケージドチミジンホスホロアミダイト体を得ることができなかった。

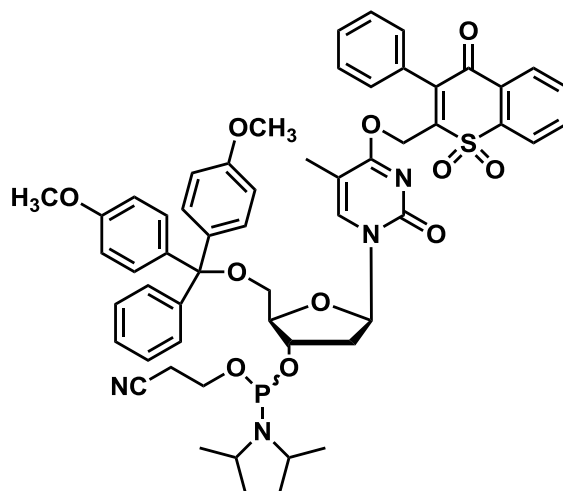
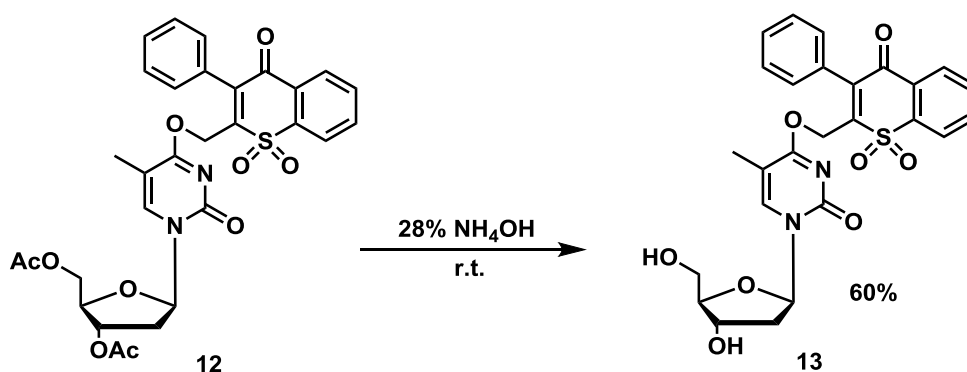


Figure 54. ケージドチミジンホスホロアミダイト体

先に述べたように、ASO の 5'末端のみに一塩基ミスマッチを有する場合でも、ASO の機能低下が期待できるため、オリゴ核酸の 5'末端にケージドチミジンを導入する戦

略に切り替えた。Figure 52 に示したオリゴ核酸の固相合成法を考察すると、オリゴ核酸の 5'末端のみに特定の核酸を導入する場合は、糖の 5'位ヒドロキシル基を DMT 基の代わりに他の保護基で保護したアミダイト体を利用することが原理的には可能と考えられた。そのため本検討では、ケージドチミジンを導入するための代替案として、DMT 基をアセチル (Acetyl, Ac) 基に代えた DNA モノマーを合成することで、オリゴ核酸の 5'末端へのケージドチミジンの導入を試みた。

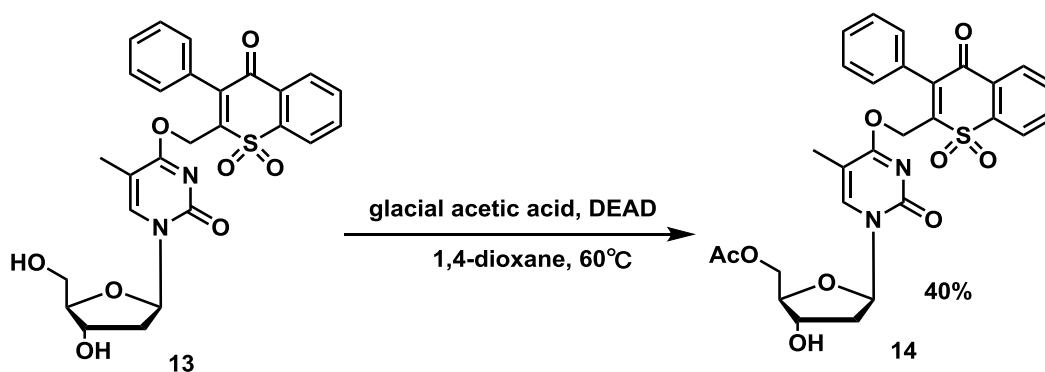
まず、ケージド Ac-チミジン **12** からアセチル基を除去するため、脱アセチル化反応 (実験項参照) を実施した (Scheme 14)。



Scheme 14. ケージド Ac-チミジン **12** の脱アセチル化反応

その結果、ケージドチミジン **13** を単離収率 60%で得ることができた。

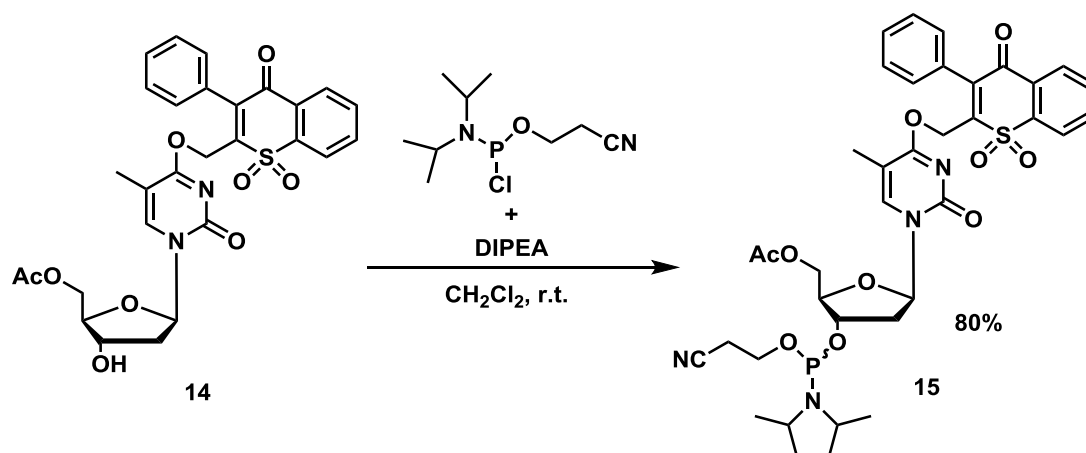
続いて、ケージドチミジン **13** の糖の 5'位ヒドロキシル基をアセチル化するため、5'位選択的アセチル化反応 (実験項参照) を実施した (Scheme 15)。



Scheme 15. ケージドチミジン **13** の 5'位選択的アセチル化反応

その結果、ケージドチミジン **13** の糖の 5'位ヒドロキシル基がアセチル基で保護された 5'-Ac ケージドチミジン **14** を単離収率 40%で得ることができた。

最後に、5'-Ac ケージドチミジン **14** の糖の 3'位ヒドロキシル基をリン酸シアノエチル基で保護するため、ホスホロアミダイト化反応 (実験項参照) を実施した (Scheme 16)。



Scheme 16. 5'-Ac ケージドチミジンのホスホロアミダイト化

その結果、目的の 5'-Ac ケージドチミジンホスホロアミダイト体 **15** を単離収率 80% (3 step の収率 : 約 20%) で得ることができた。以上の検討から、オリゴ核酸合成の固相合成法へと利用可能な 5'-Ac ケージドチミジンホスホロアミダイト体 **15** を取得することができた。

第三項 ASO へのケージドチミジン導入検討

第二項にて、5'-Ac ケージドチミジンホスホロアミダイト体 **15** を取得できたことから、約 100 μmol の **15** を利用してオリゴ核酸の 5'末端部位への導入を試みた。まず、本検討を実施するにあたり、単純に 10 個のチミジンが連続した T10 オリゴ核酸をモデル配列として利用した。尚、オリゴ核酸の合成は、ジーンデザイン株式会社へのアウトソーシングにより実施した。

オリゴ核酸合成の結果、T10 オリゴ核酸の 5'末端にケージドチミジンが導入された 5'-ケージド T10 オリゴ核酸の取得に成功した。MALDI-TOF による解析の結果から (理論値 : 3262.35, 実測値 : 3263.67)、目的のケージド T10 オリゴ核酸が得られたことが確認できた (Figure 55)。

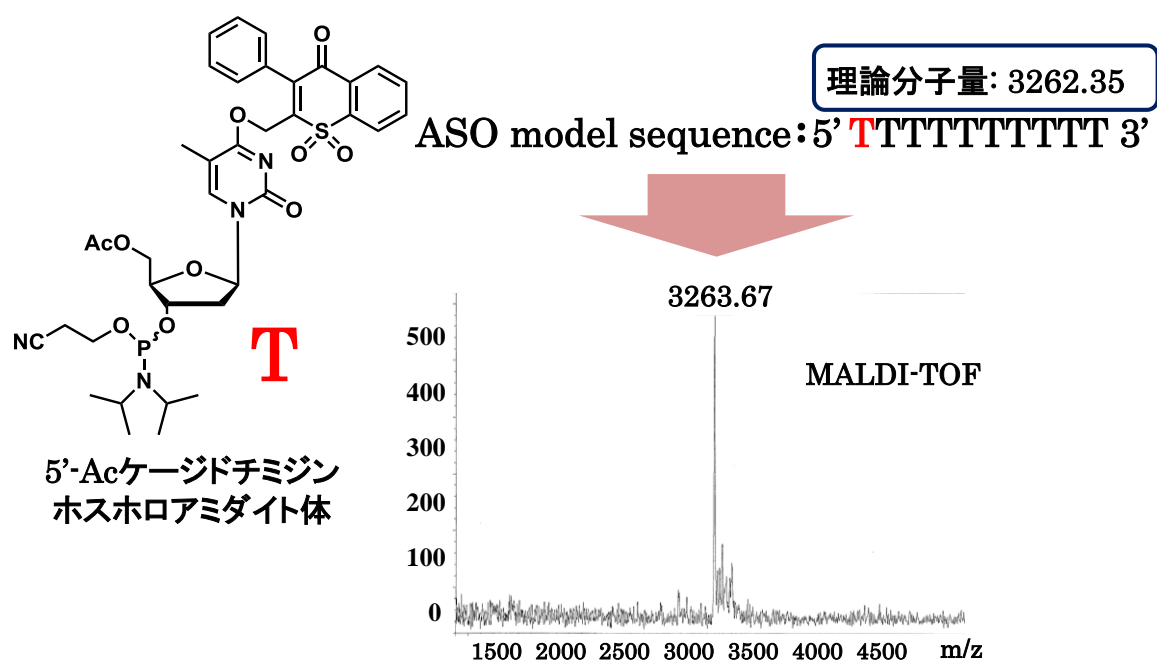


Figure 55. 5'-ケージド T10 オリゴ核酸の配列と MALDI-TOF 解析結果

以上、本節での検討より、5'-Ac ケージドチミジンホスホロアミダイト体 **15** を用いることで、オリゴ核酸の 5'末端にケージドチミジンを導入した、5'-ケージドオリゴ核酸の合成を達成した。よって、目的の機能性 ASO の 5'末端にケージド核酸を導入した『5'末端ケージド ASO』の合成が期待されることから、次節では実際に目的配列の合成と評価を行なうこととした。

第四節 新規ケージド ASO の機能評価

第一項 *in vitro* 評価系の構築

第三節より、『5'末端ケージド ASO』の合成が可能となったため、第四節では機能性 ASO の 5'末端にケージドチミジンを導入することで、本章の目的である、『光照射により機能制御ができるのみならず、蛍光測定で脱保護プロセスをモニターできるケージド ASO の開発』を試みた。既に前節において、機能性 ASO としてホタルルシフェラーゼ mRNA に対する機能性 ASO である No.1 及び No.2 を候補配列として選出した。両者のうち、No.2 は配列の 5'末端にチミジンを有しているため、この配列を主配列として検討した

目的配列中に導入されている天然のチミジンの代わりに合成したケージドチミジンを導入した場合、相補鎖であるホタルルシフェラーゼ mRNA と No.2 ASO の 5'末端部位間において本来形成されるべき相補的な水素結合が形成できなくなると考えられる。つまり、No.2 ASO の 5'末端部位に一塩基ミスマッチを生じることとなり、ASO としての活性低下が期待される。一方、この No.2 ASO は計 6 個の LNA を導入しているため、天然の DNA のみで形成される配列と比較して mRNA とのハイブリダイゼーション能が向上しており、5'末端部位の一塩基ミスマッチのみでは、ASO 活性が低下しない可能性も考えられる。以上のことから、No.2 をベースとして、導入する LNA 数及び位置を変化させた複数種類の No.2 亜型 ASO を設計し (No.2_3'-1, 3'-2, 3'-3, No.2_5'-2_3'-3)、さらに各 No.2 亜型 ASO の 5'末端部位に一塩基ミスマッ

No.2:	5' ttcgctcatcgtcttt 3'	No.2_MM:	5' atcgcctcatcgtcttt 3'
No.2_3'-1:	5' ttcgctcatcgtcttT 3'	No.2_3'-1_MM:	5' atcgcctcatcgtcttT 3'
No.2_3'-2:	5' ttcgctcatcgtctTT 3'	No.2_3'-2_MM:	5' atcgcctcatcgtctTT 3'
No.2_3'-3:	5' ttcgctcatcgtcTTT 3'	No.2_3'-3_MM:	5' atcgcctcatcgtcTTT 3'
No.2_5'-2_3'-3:	5' tTCcgctcatcgtcTTT 3'	No.2_5'-2_3'-3_MM:	5' aTCcgctcatcgtcTTT 3'

T, C: Locked Nucleic Acid (LNA)
a, t, g, c: Natural DNA

Figure 56. 各種 No.2 亜型 ASO の配列

チ (Mismatch, MM)を導入した 5'末端ミスマッチ ASO も設計した (No.2_3'-1_MM, 3'-2_MM, 3'-3_MM, No.2_5'-2_3'-3_MM) (Figure 56)。設計した 10 種の ASO の合成をジーンデザイン株式会社アウトソーシングすることで、各種 ASO を取得した。次に、これらの ASO についてホタルルシフェラーゼ発現細胞を使用した *in vitro* KD 活性評価を実施した。まず、アッセイ前日に 96well ホワイートプレートにルシフェラーゼ発現細胞 Luc-RERF 細胞を 4000 cells/well で播種した。翌日、終濃度が 50 nM となるように各 ASO をリポフェクションにより細胞に導入し、5% CO₂、37 °C 条件下で 24 時間インキュベートした。24 時間後、細胞培養液中に D-ルシフェリンを添加

(実験項を参照) し、室温にて 10 分間インキュベートした後にルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果生じるオキシルシフェリンの発光をルミノメーターにより測定した (Figure 57)。

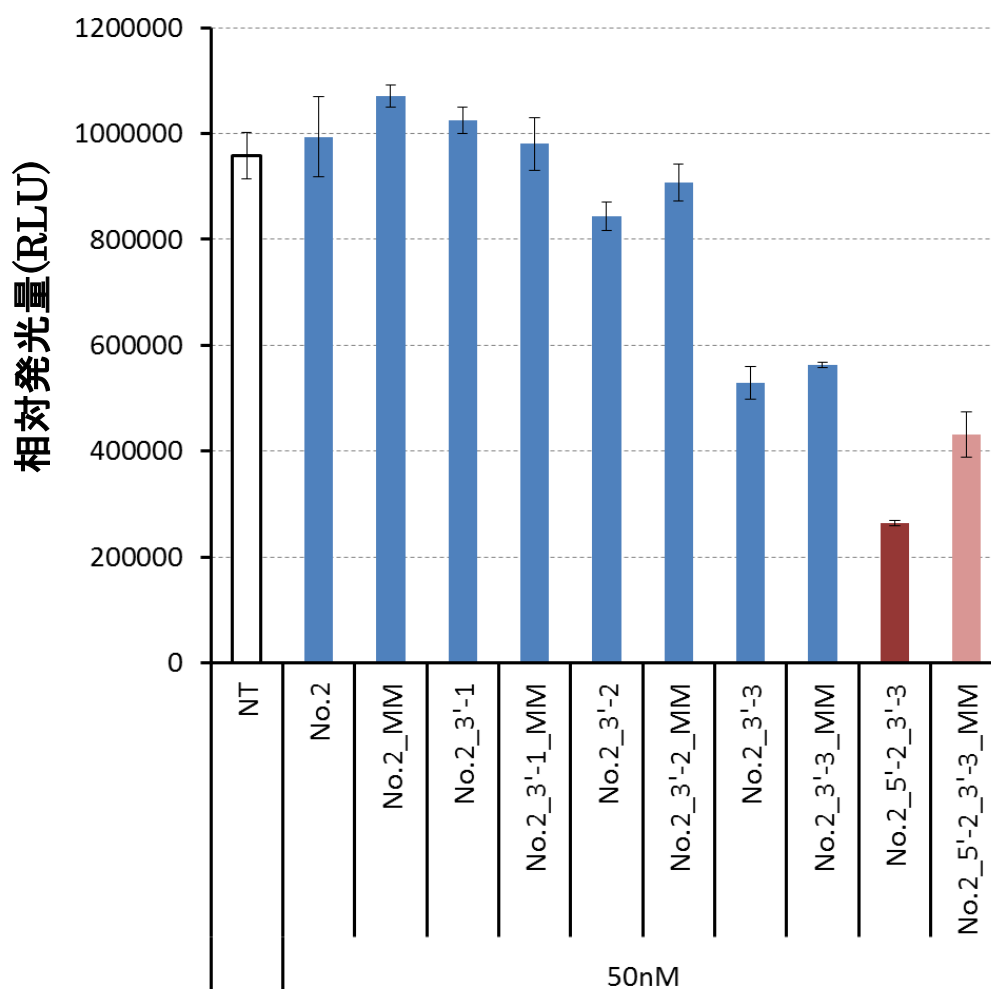


Figure 57. 各 No.2 亜型 ASO の活性評価

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果得られるオキシルシフェリン由来の生物発光を指標とした *in vitro* 活性評価の結果、未処理群 (Nontreat, NT 群) に比べて **No.2_3'-1, 3'-2** ASO 導入群では、相対発光量がほぼ変わらなかった (83 万~100 万)。そのため、**No.2_3'-1, 3'-2** ASO は終濃度 50 nM では、ルシフェラーゼ mRNA の翻訳過程を効果的に抑制できないことが判明した。次に、**No.2_3'-3** ASO 導入群では、NT 群に比べて相対発光量が有意に減少していることを確認した (約 53 万)。また、5'末端部位に一塩基ミスマッチを導入した **No.2_3'-3_MM** 導入群についても、**No.2_3'-3** ASO 導入群とほぼ同等の相対発光量が認められた (約 57 万)。従って、**No.2_3'-3** ASO については終濃度 50 nM で、ルシフェラーゼ mRNA の翻訳過程を効果的に抑制できたものの、5'末端部位に一塩基ミスマッチを導入しても、ASO 活性の低下は認められなかった。一方で、**No.2_5'-2_3'-3** 及び **No.2_5'-2_3'-3_MM** ASO 導入群では、NT 群に比べて相対発光量が有意に減少していることを確認した (24~42

万)。さらに、5'末端部位に一塩基ミスマッチを導入した **No.2_5'-2_3'-3_MM** ASO 導入群 (約 42 万)では、**No.2_5'-2_3'-3** ASO 導入群 (約 24 万)に比べ、相対発光量が高いことを確認した。相対発光量が高いということは、細胞が発現しているルシフェラーゼタンパク量が **No.2_5'-2_3'-3** ASO 導入群に比べて多いことを意味している。つまり、**No.2_5'-2_3'-3** ASO の 5'末端部位に一塩基ミスマッチを導入することで、ASO 活性が有意に減少することが判明した。

ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応を利用した本評価系では、発現しているルシフェラーゼ酵素量とルシフェリン-ルシフェラーゼ反応産物であるオキシルシフェリン由来の生物発光量が相関しているため、5'末端一塩基ミスマッチの影響による **No.2_5'-2_3'-3** ASO の活性低下をタンパク質レベルで評価できたと言える。

さらに、より直接的に ASO 活性を評価するために、リアルタイム定量 PCR 法を利用したルシフェラーゼ mRNA の測定も試みた (Figure 58)¹⁶。

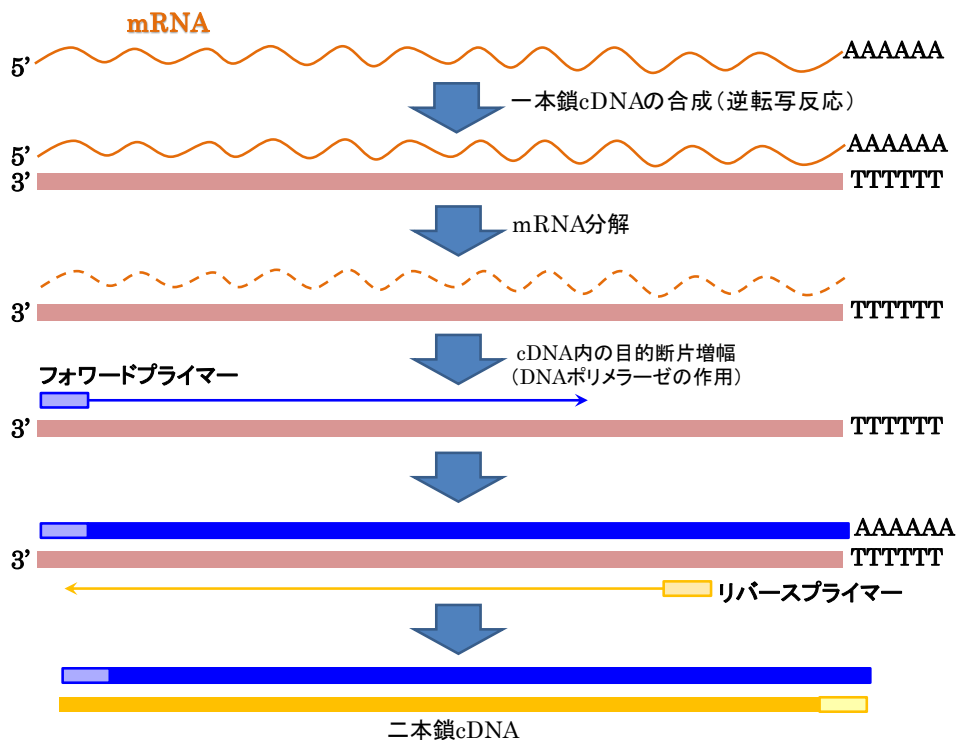


Figure 58. リアルタイム定量 PCR の原理

Figure 58 に示すように、リアルタイム定量 PCR (Polymerase Chain Reaction, PCR) 法では、まず逆転写酵素による逆転写反応により、標的遺伝子の mRNA から相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) を合成する。続いて、合成された標的遺伝子の cDNA を鋳型として標的遺伝子特異的なプライマーを用いて cDNA を増幅する。この際、二本鎖 DNA に結合することで蛍光を発する試薬 (インターカレーター: SYBR Green I) を PCR 反応系に加えておく。SYBR Green I は、PCR 反応によって合成された二本鎖 DNA に結合し、励起光の照射により蛍光を発するため、この蛍光強度を検出することで、増幅産物の生成量をモニターできる。以上

の原理を利用して、リアルタイム定量 PCR 法により 5'末端一塩基ミスマッチの影響による No.2_5'-2_3'-3 ASO の活性低下を評価した。尚、本評価を実施するにあたり、サンプル間におけるホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現量を補正するために、内部標

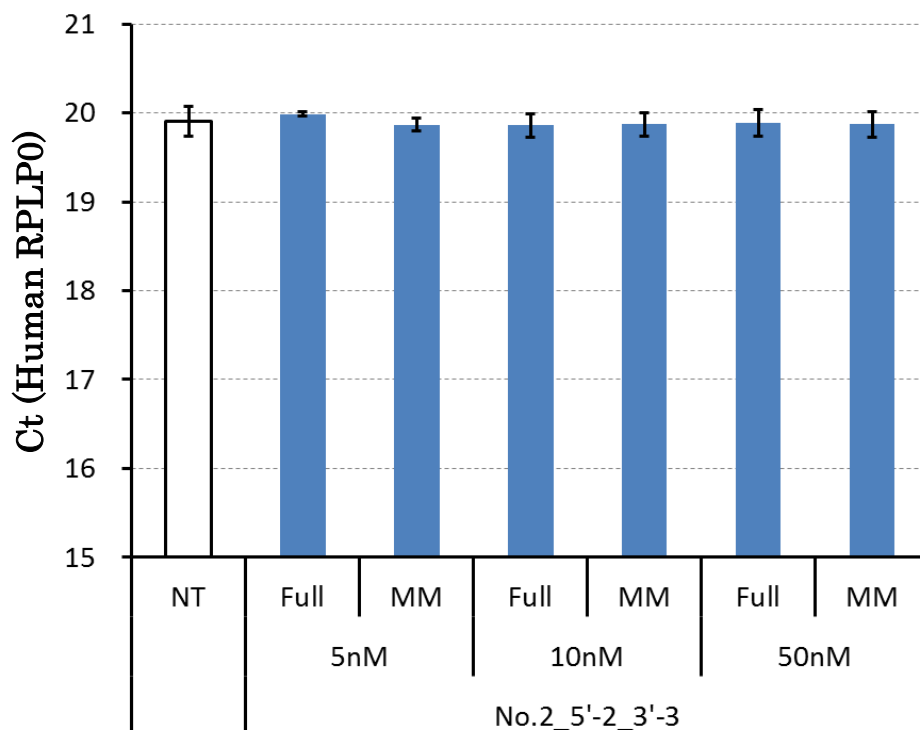


Figure 59. 本実験系におけるヒト RPLP0 遺伝子の発現変動確認

準遺伝子としてハウスキーピング遺伝子の一種である Human ribosomal protein, large, P0 (以下、ヒト RPLP0)遺伝子を採用した¹⁷。尚、この RPLP0 の発現量は、本実験系で発現変動しないことをあらかじめ確認している。Figure 59 中の Threshold Cycle (Ct 値)は、リアルタイム定量 PCR の結果得られる増殖曲線に対して任意に設定した閾値 (Threshold)が増殖曲線と交わる点として得られる値を表している。この Ct 値 (正の値をとる)が小さいほど、遺伝子の発現量が高いと考えられ、Ct 値の変動が少ないほど遺伝子発現の変動が少ないと判断できる。つまり、Figure 59 において、ヒト RPLP0 遺伝子は各サンプル群で Ct 値の変動がほとんど認められないことから、本評価系における内部標準遺伝子として適切と考えられる。

リアルタイム定量 PCR による評価法としては、 $\Delta\Delta Ct$ 法を採用した。 $\Delta\Delta Ct$ 法とは、まず標的遺伝子の発現量 (Ct1) をハウスキーピング遺伝子の発現量 (Ct2) で差し引くことで各サンプル群の ΔCt (Ct2-Ct1) を算出する。続いて、基準となる NT 群の ΔCt 値 (ΔCt_{NT}) を各サンプル群の ΔCt 値から差し引いた値として $\Delta\Delta Ct$ 値を算出する。この $\Delta\Delta Ct$ 値が負に大きいほど、mRNA の残存量がより少ないと判断できるため、各サンプル群の $\Delta\Delta Ct$ 値を比較することで、ASO 活性の議論をすることが可能となる。

リアルタイム定量 PCR の結果、5'末端部位に一塩基ミスマッチを有する

No.2_5'-2_3'-3_MM ASO 導入群では、フルマッチ (Full) の No.2_5'-2_3'-3 ASO 導入群に比べてより負に小さな $\Delta \Delta Ct$ の値を示したことから (例えば 5 nM では No.2_5'-2_3'-3: -1.1 vs No.2_5'-2_3'-3_MM: -0.8)、No.2_5'-2_3'-3_MM ASO 導入群の方が No.2_5'-2_3'-3 ASO 導入群に比べてホタルルシフェラーゼ mRNA の残存量が多いことが判明した。つまり、No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端に一塩基ミスマッチを導入することで ASO 活性が低下することを mRNA レベルで捉えることができた (Figure 60)。

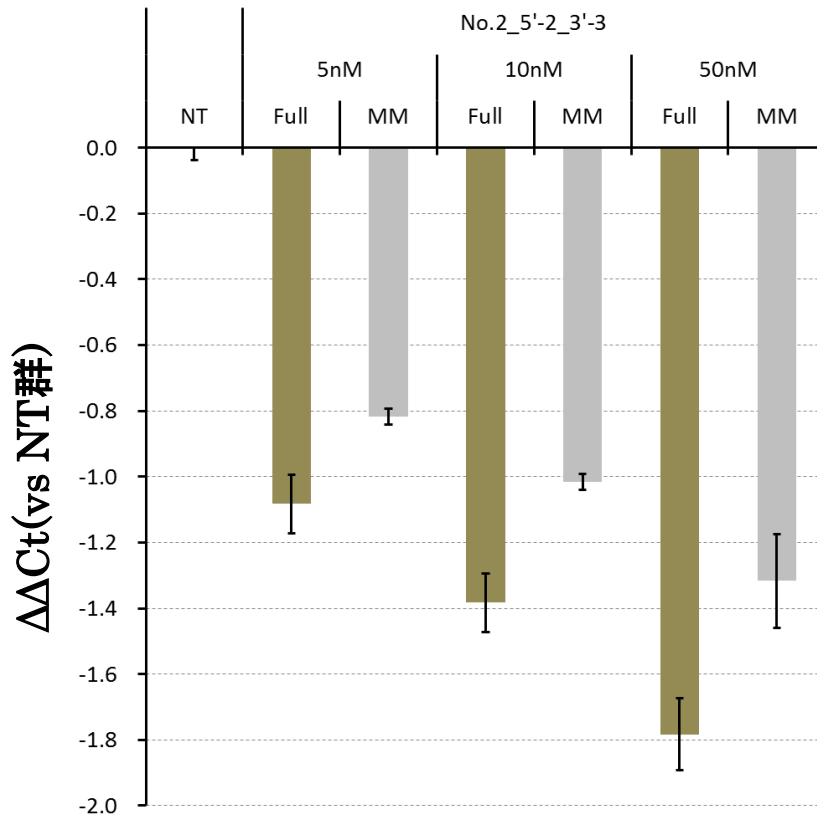


Figure 60. リアルタイム定量PCR法による No.2_5'-2_3'-3 及び 5'末端一塩基 MM 体の ASO 活性評価
内部標準遺伝子：ヒト RPLP0

以上の一連の結果より、タンパク質レベル及び mRNA レベルの双方において、No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端部位に一塩基ミスマッチを導入することで、ASO としての活性が有意に低下することが確認できた。この結果から、No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端部位にケージドチミジンを導入し、故意にミスマッチを生じさせることで、一時的に No.2_5'-2_3'-3 ASO の活性を抑制できる確証が得られた。

第二項 新規ケージド ASO の *in vitro* 脱保護評価

第一項の検討より、No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端チミジン部位をミスマッチした塩基に変換することで、No.2_5'-2_3'-3 ASO の活性を抑制できる確証が得られた。そのため、第二項では No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端チミジン部位をケージドチミジンに変換したケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の合成に着手した。

まず、第三節第二項で実施した合成法により、5'-Ac ケージドチミジンホスホロアミダイト体 **15** を合成し、約 50 μmol をジーンデザイン株式会社へ送付した。オリゴ核酸合成をジーンデザイン株式会社へアウトソーシングすることで、目的のケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の取得に成功した。MALDI-TOF による解析結果から（理論値：5466.56, 実測値：5466.10）、目的のケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO が得られたことを確認できた（Figure 61）。

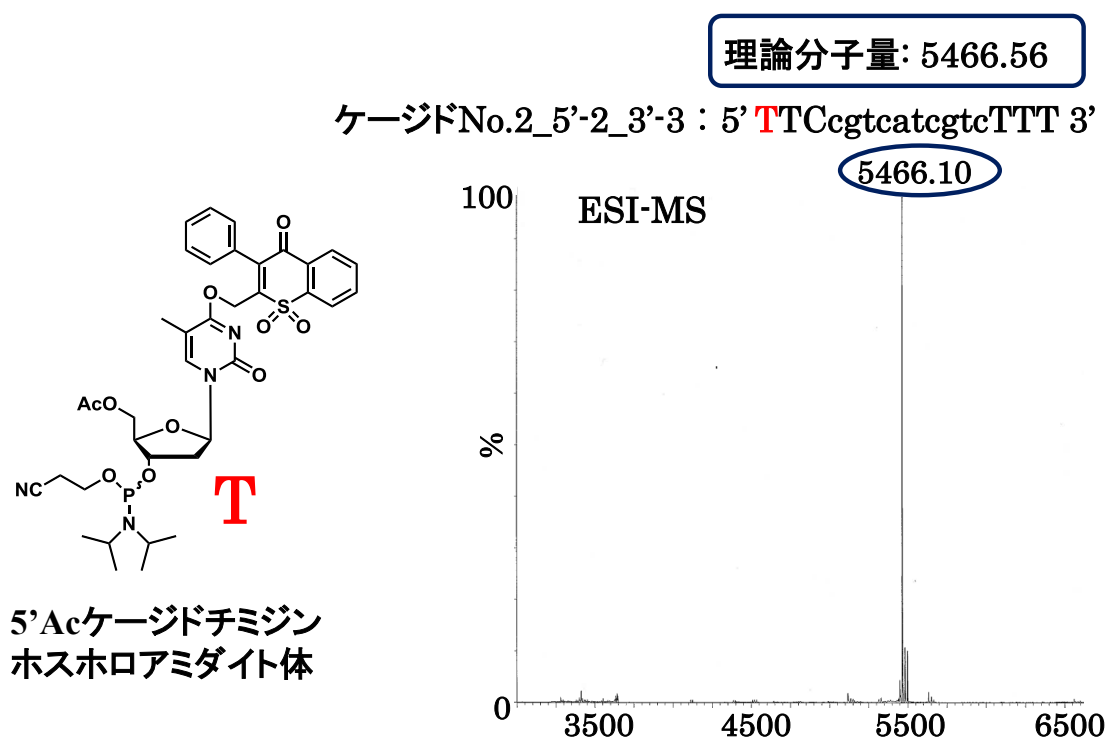


Figure 61. ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の配列と MALDI-TOF 解析結果

以上の結果から、機能性 ASO の 5'末端部位にケージドチミジンを導入したケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の取得に成功した。

次に、ルシフェラーゼ発現細胞である Luc-RERF 細胞を用いて、ケージド No.2_5'-2_3'-3 及び No.2_5'-2_3'-3 ASO の *in vitro* KD 活性を評価した。本検討は、光照射脱保護検討を実施するに先立ち、No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端部位にケージドチミジンを導入したことによる、ASO 活性の低下を確認するために実施した。ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応の結果得られる生物発光を指標とした *in vitro* 活性評価の結果、未処理群 (NT 群: 約 65 万) に比べてケージド No.2_5'-2_3'-3、

No.2_5'-2_3'-3_MM 及び、No.2_5'-2_3'-3 ASO 導入群では、相対発光量が有意に減少していることを確認した（例えば 20 nM では、ケージド No.2_5'-2_3'-3: 約 35 万, No.2_5'-2_3'-3_MM: 約 26 万, No.2_5'-2_3'-3: 約 23 万）（Figure 62）。

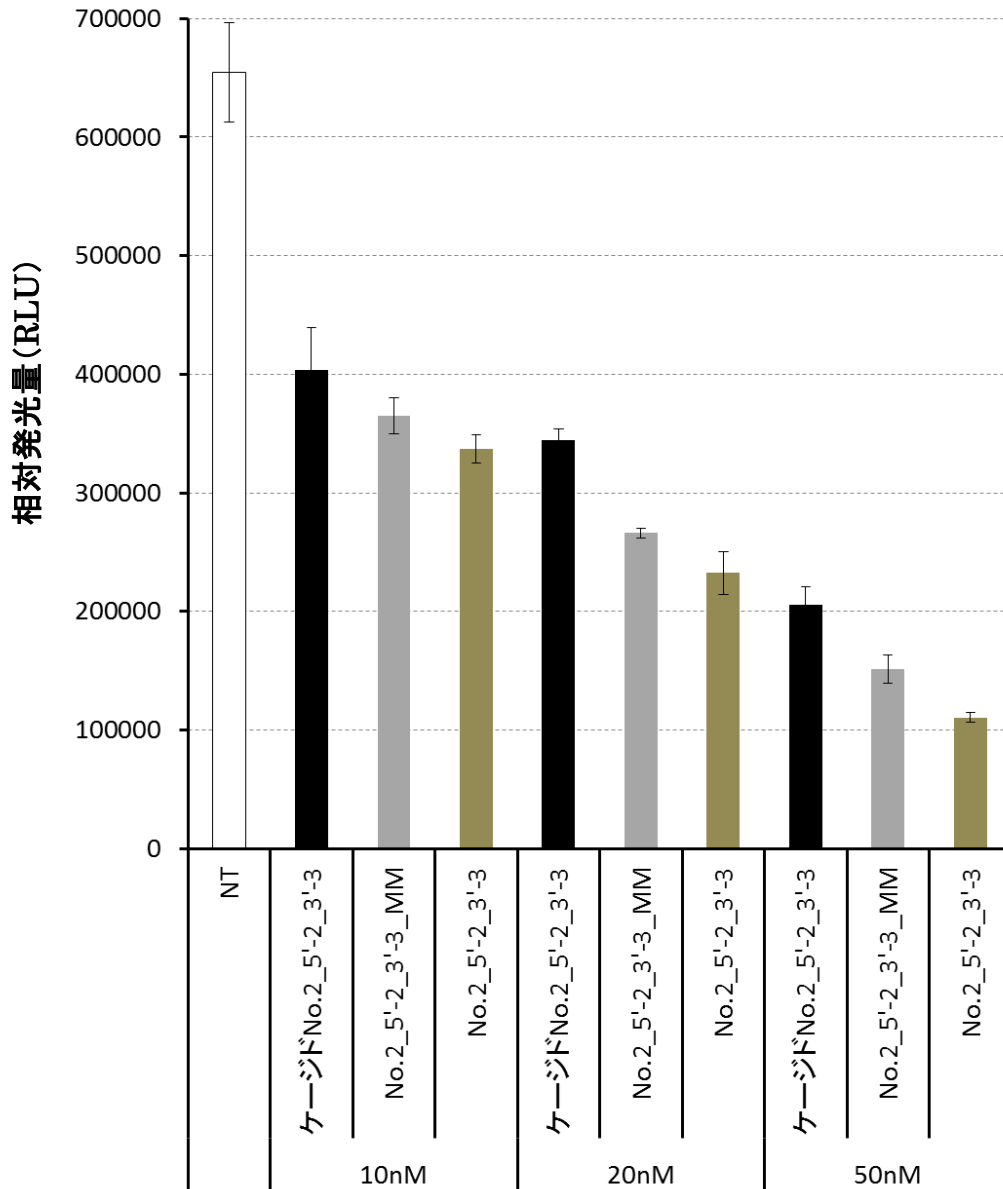


Figure 62. ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の *in vitro* KD 活性評価

続いて、5'末端部位に一塩基ミスマッチを導入した No.2_5'-2_3'-3_MM ASO 導入群では、No.2_5'-2_3'-3 ASO 導入群に比べ、相対発光量が高いことを確認した。つまり、No.2_5'-2_3'-3_MM ASO (20 nM では約 26 万)は No.2_5'-2_3'-3 ASO (20 nM では約 23 万)に比べて ASO 活性が低下していることを再確認した。また、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO (20 nM では約 35 万)でも No.2_5'-2_3'-3 ASO に比べて相対発光量が高いことから、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO は No.2_5'-2_3'-3 ASO に比べて ASO 活性が低下していることを確認した。さらに興味深いことに、ケージド

No.2_5'-2_3'-3 ASO は No.2_5'-2_3'-3_MM ASO よりも相対発光量が高いことから、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO は No.2_5'-2_3'-3_MM ASO よりもさらなる ASO 活性の低下が生じていることが示唆された。これは、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5' 末端に導入したケージドチミジン内のチオクロモン型光解離性保護基が嵩高いために、チミン-アデニン間の水素結合形成阻害に加えて立体障害が生じたことで、ルシフェラーゼ mRNA と ASO との間でより相補鎖形成が阻害されたことに起因すると推測している。

以上を踏まえ、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO に対する光照射脱保護検討に着手した。ここで、ジーンデザイン社より合成/納品されたケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の量は、約 200 nmol と非常に少量であるため、光照射脱保護検討として実施可能な項目が限られた。また、光照射脱保護反応後に実施する Luc-RERF 細胞を用いた *in vitro* 活性評価では、各 ASO の濃度を 20 nM で使用することを想定した。そのため、1 μ M のケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO 水溶液を調製し、光照射脱保護検討を実施することとした。

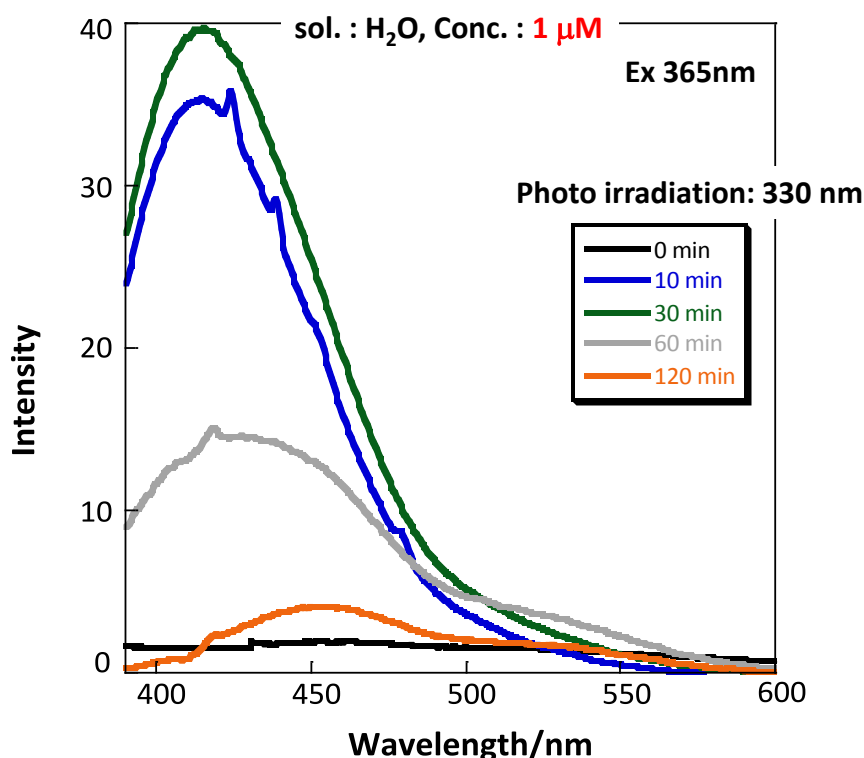


Figure 63. ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の光照射脱保護反応に伴う蛍光スペクトル。

条件: 蛍光励起波長: 365 nm; 光源: 330 nm Xenon ランプ

溶液: 1 μ M 水溶液; 最大蛍光波長: 416 nm; バンド幅 5 nm, 感度 Medium

所属研究室では数種の光源を有しているが、本検討では 330 nm Xenon ランプを光源に採用した。その理由は、チミジン二量体化を引き起こす懸念の無い 320 nm 以上

の波長を有する光源のうち最もエネルギーが高く、さらに Xenon ランプは光照射中に熱を発生することが無い光源であったからである。また、本光源を使用しても光照射脱保護反応が認められない場合は、より長波長の光に変更しても光照射脱保護反応が認められない可能性が高いと考えられたため、まずは 330 nm Xenon ランプを用いた光照射脱保護検討を実施することとした。

1 μ M のケージド **No.2_5'-2_3'-3** オリゴ核酸水溶液に対して 330 nm Xenon ランプを光源に、光照射脱保護検討を実施した。その結果、最大蛍光波長を 416 nm とする蛍光強度が、光照射時間依存的に増加することを確認した (Figure 63)。この最大蛍光波長を 416 nm とする蛍光スペクトルは、ケージド Ac-チミジンを含む 1% DMSO を含む水溶液中で 365 nm 光照射により得られた結果 (Figure 27a) と合致していることから、生じた蛍光性分子種は Figure 64 で示した構造である可能性が推測された。

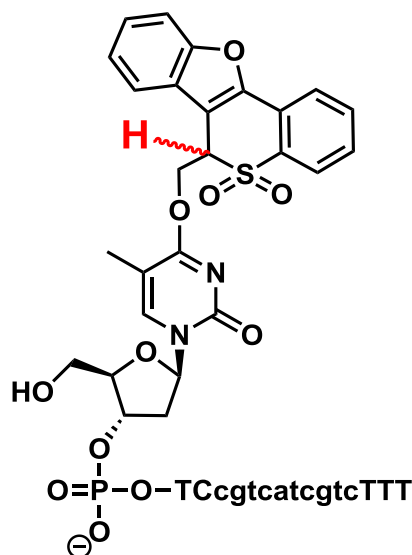


Figure 64. ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO への光照射により生じた蛍光性分子種の推定構造

第四項において、ケージド Ac-チミジンに光照射を実施すると、脱保護過程の中間体として蛍光性分子種 **A** 及び **B** が生成することを述べた。この段階では、チオクロモン型光解離性保護基は完全に外れておらず、Ac-チミジン分子内のチミン部位に結合した状態であるため、デオキシアデノシン分子内のアデニンと水素結合を形成できないと推測される。この中間体に対してさらに光照射を追加すると、チオクロモン型光解離性保護基が完全に外れ、元の Ac-チミジン分子が再生されることを確認している。これらの知見から、ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO の場合においても同様の現象が生じていると推測された。すなわち、最大蛍光波長を 416 nm とする蛍光強度が増加を示している光照射時間 10 分及び 30 分時点では、チオクロモン型光解離性保護基が完全に外れておらず Figure 64 に示した中間体が生成しており、蛍光強度が減少した光照射時間 60 分及び 120 分時点でチオクロモン型光解離性保護基が外れている可能性を考えた。そのため、光照射時間 60 分及び 120 分時点のケージド **No.2_5'-2_3'-3**

ASO の脱保護検証を、Luc-RERF 細胞を用いた *in vitro* 活性評価により実施した。各光照射後のケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO を終濃度 20 nM となるように Luc-RERF 細胞に添加し、5% CO₂ 存在下 37 °C で 24 時間インキュベートした。24 時間後、ルシフェリンールシフェラーゼ反応の結果得られる生物発光を指標とした *in vitro* 活性評価、及びルシフェラーゼ mRNA 量を直接評価するためリアルタイム定量 PCR を実施した（実験項参照）。

まずルシフェリンールシフェラーゼ評価の結果、**No.2_5'-2_3'-3_MM** ASO（約 33 万）及び、光照射していないケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO（約 36 万）では、**No.2_5'-2_3'-3** ASO（約 26 万）に比べて高い発光量を示すことを確認した。これはつまり、**No.2_5'-2_3'-3_MM** ASO 及び、光照射していないケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO は、**No.2_5'-2_3'-3** ASO に比べて ASO 活性が低下していることを意味している。続いて、ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO に対して 330 nm の光を 120 分照射したサンプル（約 28 万）では、光を照射していないサンプル（約 36 万）に比べて、有意に発光量

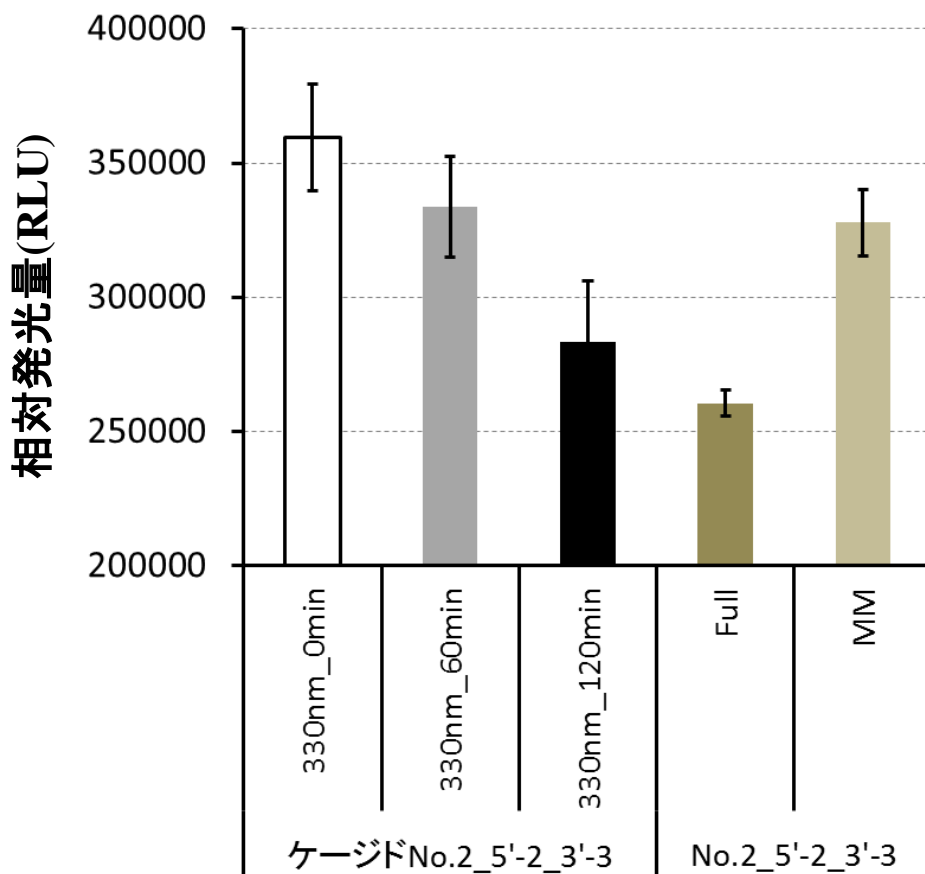


Figure 65. ルシフェリンールシフェラーゼ反応を利用した、ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO の光照射脱保護評価

が低下していることを確認した。この結果から、光を 120 分照射したサンプルでは ASO としての機能が復元されたことが示唆された。一方で、光を 60 分照射したサンプル（約 33 万）では光を照射していないサンプルに比べて有意に発光量の低下が認め

られるものの、光を 120 分照射したサンプルには及ばなかった (Figure 65)。この結果は、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO に光を照射した際に観測された蛍光スペクトルにおけるピーク挙動に一致している。また、330 nm の光を 120 分照射したサンプルでも、ASO 活性が No.2_5'-2_3'-3 ASO に及ばないことから、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO を元の ASO 活性まで復元させるためには、330 nm の光を 120 分以上照射する必要性が示唆された。

次に、リアルタイム定量 PCR により直接ルシフェラーゼ mRNA 量を評価した (実験項参照)。その結果、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO に対して 330 nm の光を 120 分照射したサンプル ($\Delta \Delta Ct$: -1.1)では、光照射していないサンプル ($\Delta \Delta Ct$: -0.55)に比べて、ルシフェラーゼ mRNA 量が有意に低下していることを確認した。一方で、光を 60 分照射したサンプルでは光照射していないサンプルに比べてルシフェラーゼ mRNA 量の低下が認められたものの ($\Delta \Delta Ct$: -0.75)、その抑制率は光を 120 分照射したサンプル ($\Delta \Delta Ct$: -1.1)には及ばなかった (Figure 66)。この結果は、Figure 65 で得られた発光量の結果と完全に一致している。

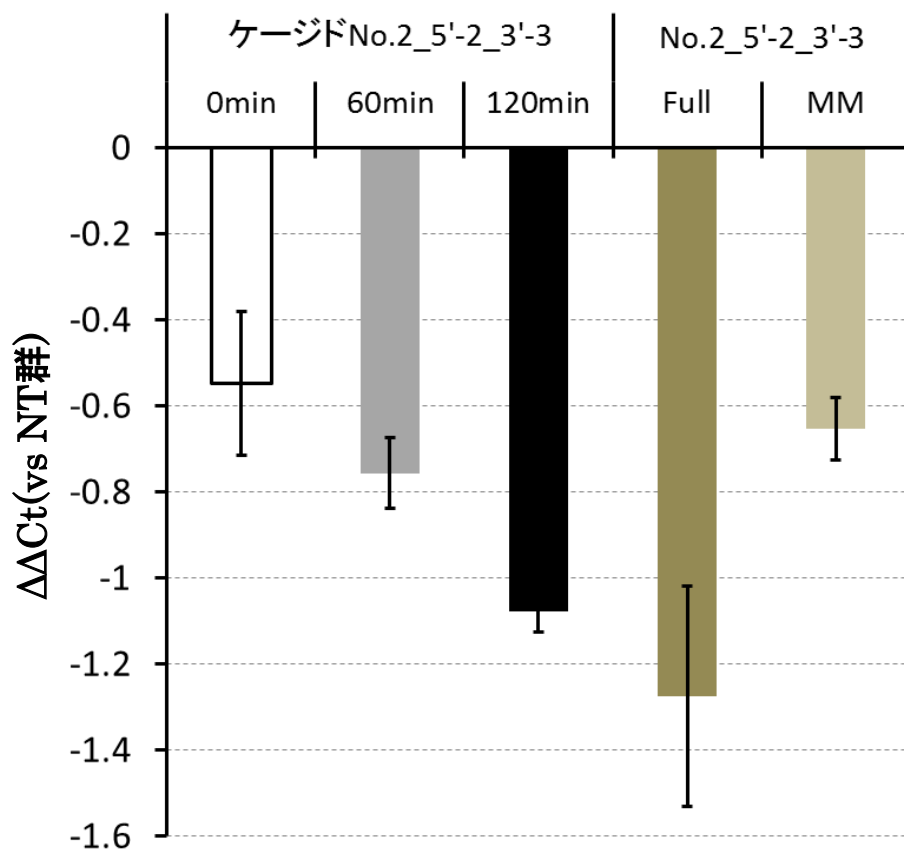


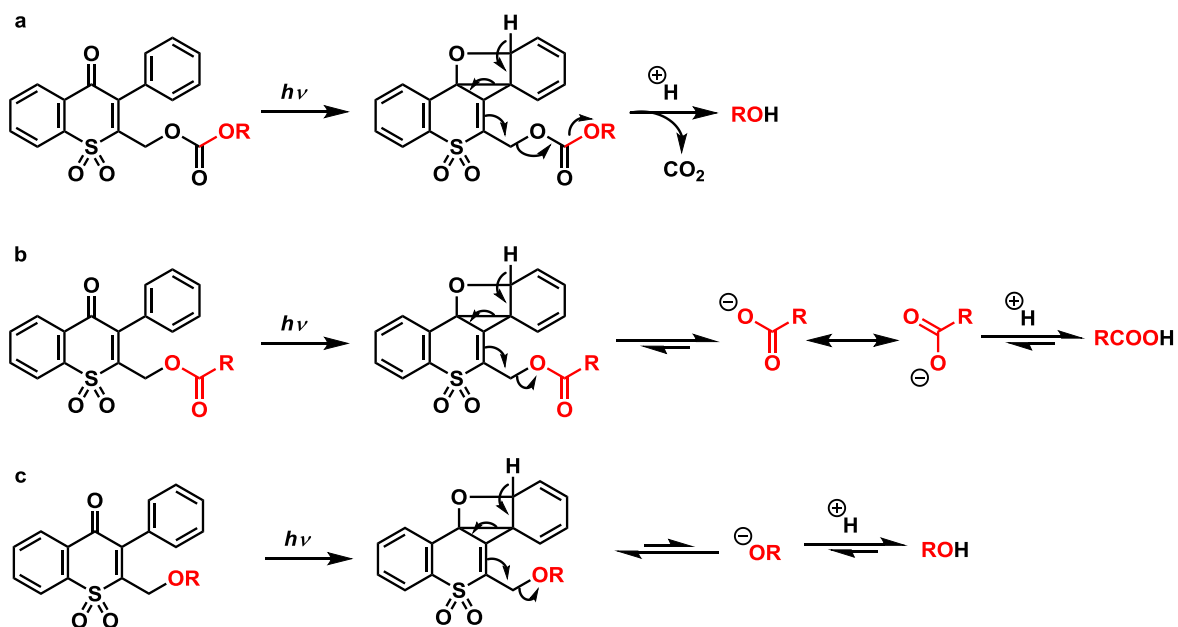
Figure 66. リアルタイム定量 PCR 法による、ケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の光照射脱保護評価
内部標準遺伝子：ヒト RPLP0

以上の結果をまとめると、タンパク質レベル、及び mRNA レベルの双方において、ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO に 330 nm の光を照射することで、元の ASO 活性の復元を確認することができた。また、光照射 60 分に比べて 120 分の方が、元の ASO 活性が顕著に復元されていることが確認できた。

本検討により、水溶液中においてケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO に対して 330 nm の光を照射した結果、光照射時間依存的に最大蛍光波長を 416 nm とする蛍光強度が増加することを確認した。さらに、光照射 60 分及び 120 分後のケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO を、ルシフェラーゼ発現細胞に導入した結果、ASO 活性が向上していることを確認した。この一連の結果から、光照射のみで ASO の機能制御が可能であることを実証した。また、光照射 60 分よりも 120 分後サンプルの方が、ASO 活性がより向上することを確認した。この結果は、Figure 63 に示したケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO への光照射時に得られた蛍光スペクトルの結果とも相関が認められる。ケージド Ac-チミジン **12** を用いた光照射脱保護の詳細な検討より、光照射後に生成する主な蛍光性分子種は、水溶液中において最大蛍光波長を 416 nm とする蛍光スペクトルを示すことが判明している。さらに、この最大蛍光波長 416 nm に由来する蛍光性分子種は第二節第三項において Figure 45 で示した構造であることが推測された。これらの知見を統合すると、ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO に対して 60 分照射した時点では、最大蛍光波長 416 nm とする蛍光スペクトルが認められていることから、大多数が Figure 64 で示す中間体として残存していると推測された。つまり、ケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO のうち、大多数が Figure 64 の中間体に変換された状態で存在し、その中の一部でチオクロモン型光解離性保護基が完全に外れた結果、ASO としての機能が復元されたと考察できる。また、120 分照射したサンプルでは、蛍光スペクトル中の最大蛍光波長 416 nm の蛍光強度がほぼ消失していることから、Figure 64 で示す中間体の大多数でチオクロモン型光解離性保護基が完全に外れた結果、ASO としての機能がほぼ復元されたと考察できる。一方で、本ケージド ASO から ASO の機能を完全に復元させるためには、330 nm の光を 120 分以上照射する必要があることも明らかとなった。そのため、長時間の紫外光照射に伴う細胞毒性の観点から、当初の目的であった細胞内光脱保護検討を実施することは困難であると判断し、本検討を終了させるに至った。

本章では、チオクロモン型保護基を活用したケージド化合物の細胞内光脱保護を達成するために、第二章で得られた知見を総動員した。つまり以下の 4 条件、①生理活性分子自体が 365 nm の光を吸収しない事、②エステラーゼのような細胞内酵素により分解されない結合様式で光解離性保護基を導入する事、③脱保護後の生理活性分子の半減期が長い事、④脱保護に伴い副生する蛍光性化合物の蛍光を活用できる事、といった点を考慮した結果、ASO を最終的なターゲット分子に設定した。この設定自体は良かったが、条件④に関しては想定外の結果が得られた。当初の目論見では、光照射の結果、安定な反応中間体を経ることなく光反応が進行し、元の生理活性分子が素早く復元されると同時に蛍光性の副生成物が得られる事を想定していた。しかし、

本検討の結果、光照射により蛍光性の反応中間体が生成することが判明した。さらに、この中間体に光を照射した結果、さらなる光反応が進行し、元の生理活性分子が復元することが明らかとなった。以上の現象を考察すると、本チオクロモン保護基をエーテル結合を介して導入したケージドチミジンは、光脱保護反応効率が非常に悪くなった可能性が考えられる。つまり、光照射により2ステップで反応が進行するだけでなく、蛍光性の中間体自身が光を吸収することから、本来光脱保護反応に使われるべき光エネルギーが見かけ上減少したと考えられる。つまり、間接的に①の条件を満たしていないことになる。その結果として、本ケージド ASO の機能を完全に復元させるために120分以上の長時間にわたる光照射が必要であったと考察できる。ここで、第二章で検討したケージドトルシフェリンの場合は、保護基をエステル結合で導入していたことから、保護基の切断後に比較的安定なカルボキシラートアニオンが生成すると考えられる (Scheme 17b)。一方で、ケージドチミジンの場合は保護基をエーテル結合で導入しており、この場合は保護基の切断後にカルボキシラートアニオンよりも不安定なアルコキシドアニオンが生成すると考えられる (Scheme 17c)。つまり、保護基の切断後に生成する化学種の安定性の違いが、エステル結合とエーテル結合における光脱保護効率の違いに起因していると考えられる。尚、カーボネート結合ではエーテル結合と同じく保護基の切断後にアルコキシドアニオンが生成すると考えられるが、保護基の切断後に脱炭酸反応が起こるために、その反応は不可逆反応となる (Scheme 17a)¹⁰。そのため、カーボネート結合の方がエーテル結合に比べて光脱保護効率が高くなると考えられる。



Scheme 17. 各種化合物の光脱保護メカニズム

(a) カーボネート結合からのアルコールの再生、(b) エステル結合からのカルボン酸の再生、(c) エーテル結合からのアルコールの再生

以上の考察から、エステル結合を有するケージドルシフェリンよりも、エーテル結合を有するケージドチミジンでは、より光脱保護反応が進行し難かったと考えられる。

第五節 小括

本章では、DNA の一種であるチミジンをターゲット分子に選定し、チオクロモン型光解離性保護基をチミン塩基 *O*-4 部位にエーテル結合を介して導入することでケージド Ac-チミジン **12** を合成した。続いて、ケージド Ac-チミジン **12** への光照射脱保護検討により、光照射時間依存的に蛍光強度が増加（最大蛍光波長はメタノール中：408 nm、水溶液中：416 nm）することを確認した。ここで、チオクロモン型光解離性保護基をエステル結合を介して導入した場合には、光照射後に蛍光性の四環性化合物が生成することが過去の検討で明らかとなっている。一方、蛍光スペクトル及び HPLC 分析の結果、ケージド Ac-チミジン **12** への光照射後に生成する主な蛍光性分子種は、四環性化合物とは異なる分子種であることが明らかとなった。

第二節では、この新規蛍光性分子種について詳細な検討を実施した結果、①HPLC 分析において近接した二つのピーク（蛍光性分子種 **A** 及び **B** と命名）が確認された事、②二つの各ピークを分取して ¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルを測定した結果、ケージド Ac-チミジン **12** と酷似したスペクトルが得られ、且つケージド Ac-チミジン、蛍光性分子種 **A** 及び **B** でプロトン数、カーボン数が一致した事、③DEPT ならびに COSY、HMQC といった二次元 NMR 測定の結果、リンカーのメチレン鎖の隣に、新たにメチン由来のカーボンが生じている事が確認された事、④同一サンプルに対する ESIMS スペクトル測定の結果、ケージド Ac-チミジン **12**、蛍光性分子種 **A**、**B** の三者で同一の値 (631.13 *m/z*) が確認された事（この数値はケージド Ac-チミジン **12** の Na⁺付加により認められる値と一致する）、⑤蛍光性分子種 **A**、**B** の混合物に対して経時的に光照射した結果、光照射時間依存的に Ac-チミジンの生成が確認された事、⑥光反応によりチオクロモン型光解離性保護基から蛍光性四環性化合物が生成する際のメカニズム及び Benzoin 誘導体の光脱保護メカニズムが可能性のある反応機構として参考にできる事、といった①～⑥の知見を勘案して合理的に考えると、蛍光性分子種 **A** 及び **B** はケージド Ac-チミジン **12** の光反応中間体として Scheme 13 で示した構造を有しており、各々がジアステレオマーの関係であるという結論に至った。

第三節では、ケージドチミジンを機能性 ASO に導入するために、ケージド Ac-チミジン **12** の分子変換を行なうことで、オリゴ核酸合成に利用可能な 5'-Ac ケージドチミジンホスホロアミダイト体 **15** を合成した。さらに、モデル配列である T10 オリゴ核酸の 5'末端部位に、ケージドチミジンを導入したケージド T10 オリゴ核酸の取得に成功した。

第四節では、取得した No.2_5'-2_3'-3 ASO の 5'末端部位にケージドチミジンを導入したケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO の取得に成功した。また、水溶液中においてケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO が光脱保護され、元の ASO 活性が復元されるのみならず、一度増加した蛍光の減少を指標に ASO 活性の復元を予想することが可能であった (Figure 63, 65)。また、その結果は該当する生理活性評価と完全に一致するもので

あり、『蛍光測定のみで脱保護プロセスをモニターする』という本テーマ最大の目標を達成する結果を得ることができた。以上の結果から、今後は蛍光特性を活かした保護基の構造改良を行なうことで、より実用的なケージド化合物の創成が期待される。

第六章 実験項

TLC 板 : MERCK mesh size 60Å

検出機器 : UV ランプ (254 nm)

呈色試薬 : アニスアルデヒド、リン酸モリブデン

シリカゲル : MERCK 40–63 μm silica gel 60

NMR : JEOL JNM–ECP 500 ¹H NMR 500MHz, ¹³C NMR 125 MHz

内部標準 : ¹H NMR TMS (0 ppm), CDCl₃ (7.26 ppm)

¹³C NMR CDCl₃ の中点のピーク (77.0 ppm)

IR : JASCO FT/IR-4200, KBr 法, neat 法

MS : JEOL JMS-700, EI, DARTMS or ESI

紫外可視分光光度計 : JASCO V-630, 光路長 1 cm のセルを使用

分光蛍光光度計 : JASCO FP-6500, 光路長 1 cm の四面透過のセルを使用
中圧カラム

(MPLC) : Biotage Isolera One, SNAP HP-Sil Cartridge

検出波長 : 254 nm and 280 nm

UV ランプ : フナコシ Handheld UV Lamp, 110 W, UVL-56, 365 nm, 100 V

445 nm 半導体レーザー : 上海ドリームレーザー社製

Xenon ランプ : 朝日分光 MAX-303

HPLC : HITACHI

検出機器 : UV detector (L-2400)

カラムオーブン : L-2300, Temp. = 23 °C

ポンプ : L-2130

カラム : ODS (Octa Decyl Silyl)

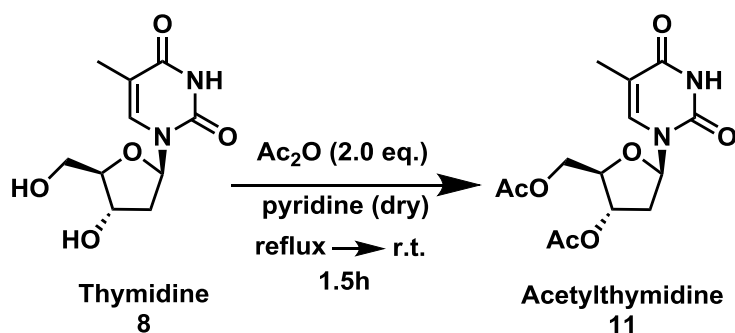
カラム型番 : ODS 2000 型

ルミノメーター : Molecular Device SpectraMax L (RLU / 0.25 sec)

PCR system : PCR GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems 社)

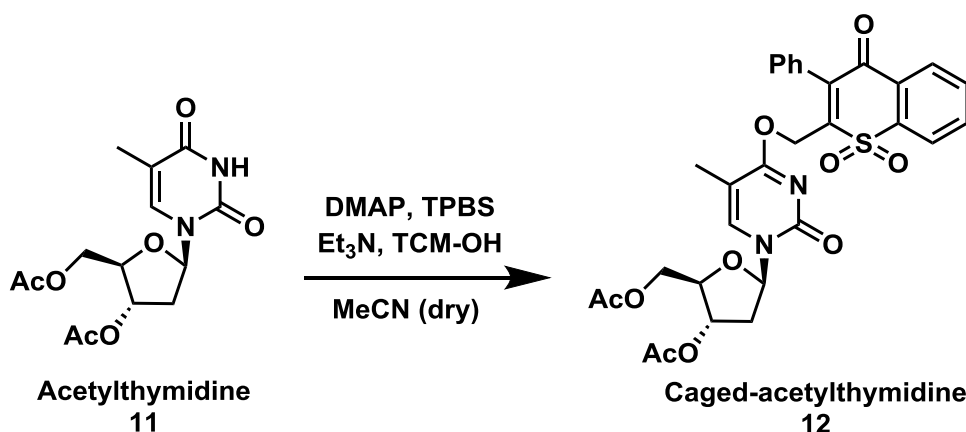
リアルタイム定量 PCR system : Applied Biosystems 7500

11 の合成²



窒素雰囲気下、30 mL 二口ナスフラスコにチミジン 1.00 g (4.13 mmol)を加えた後、Pyridine 1.5 mLに溶解し、無水酢酸 0.78 mL (8.26 mmol)を添加した。90 °C に設定したオイルバスに容器を浸し、30 min 加熱攪拌した。30 min 後、室温に放冷して 1 h 攪拌した。TLC (展開溶媒; 酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1, 検出試薬; アニスアルデヒド)でチミジンのスポットの消失を確認した後、CHCl₃で抽出し、1 N HCl と sat. NaHCO₃で反応溶液を洗浄し、MgSO₄で乾燥した。乾燥後、吸引濾過で乾燥剤を取り除き、エバポレーターで濃縮した。ジエチルエーテルで pyridine を共沸し、白色固体を析出させた後、エタノールで再結晶した。収率 82%で目的物 **11** を得た。TLC : R_f = 0.5 (展開溶媒; 酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1) , 青色に呈色. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 8.65 (b, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.33 (dd, *J* = 10.0, 5.0 Hz, 1H), 5.21 (m, 1H), 4.35 (m, 2H), 4.25 (m, 1H), 2.47 (dt, *J* = 7.5, 5.0 Hz, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.94 (s, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 170.4, 170.2, 163.3, 150.2, 134.5, 111.6, 84.7, 82.1, 74.1, 63.9, 37.5, 20.9, 20.8, 12.7.

12 の合成

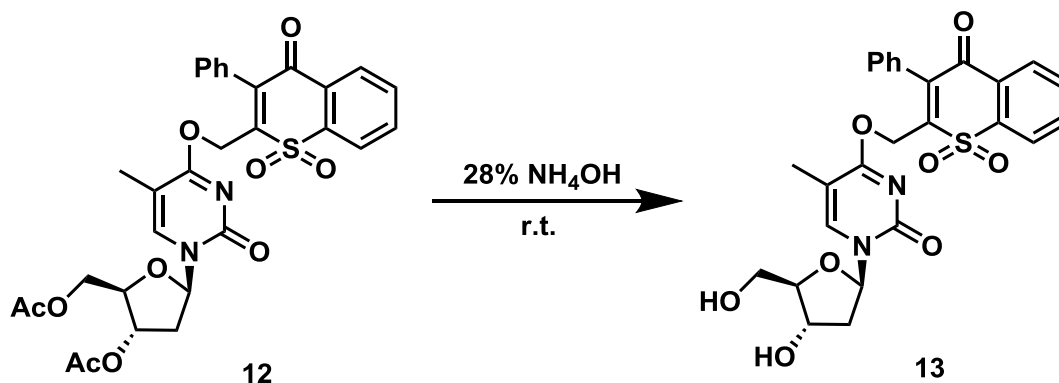


窒素雰囲気下、ヒートガンで乾燥した 30 mL 二口ナスフラスコに **11** を 100 mg (0.321 mmol)、DMAP 8 mg (0.064 mmol)、TPBS 117 mg (0.385 mmol)を加え、MeCNで溶解した後、45 °C に設定したオイルバスに浸して 4 h 加熱攪拌することで

11 を活性化させた。TLC (酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1, 検出試薬: アニスアルデヒド) で活性化体の生成を確認した後、TCM-OH 96 mg (0.321 mmol) を添加し、12 h 再び加熱攪拌した。TLC で目的物を確認した後、CHCl₃ で抽出し、1 N HCl と sat. NaHCO₃ で反応溶液を洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。乾燥後、吸引濾過で乾燥剤を取り除き、エバポレーターで濃縮した。残渣を MPLC で精製し、目的化合物 **12** を薄黄色固体として収率 27% で得た。

TLC : R_f = 0.24 (展開溶媒; 酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1) , 青色に呈色. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.16 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.84 (dt, *J* = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.74 (dt, *J* = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.28 (dd, *J* = 8.5, 5.0 Hz, 1H), 5.21 (dd, *J* = 60.0, 17.0 Hz, 2H), 5.19 (m, 1H), 4.34 (m, 2H), 4.24 (dd, *J* = 5.5, 3.5 Hz, 1H), 2.50 (ddd, *J* = 14.0, 5.8, 2.0 Hz, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.89 (d, *J* = 1.0 Hz, 3H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 178.1, 170.5, 170.3, 162.6, 150.3, 146.2, 141.7, 141.1, 134.6, 133.3, 133.0, 131.7, 129.3, 129.0, 128.9, 128.8, 128.5, 123.0, 110.3, 85.9, 82.4, 74.4, 64.0, 38.7, 37.9, 21.0, 21.0, 13.5; IR (neat) ν_{max}: 3648, 3086, 3063, 3016, 2950, 2359, 2339, 1743, 1713, 1661, 1464, 1373, 1307, 1231, 1059, 757 cm⁻¹; HRMS (ESI) Calcd for C₃₀H₂₈N₂NaO₁₀S [M+Na]⁺: 631.1362; Found 631.1362.

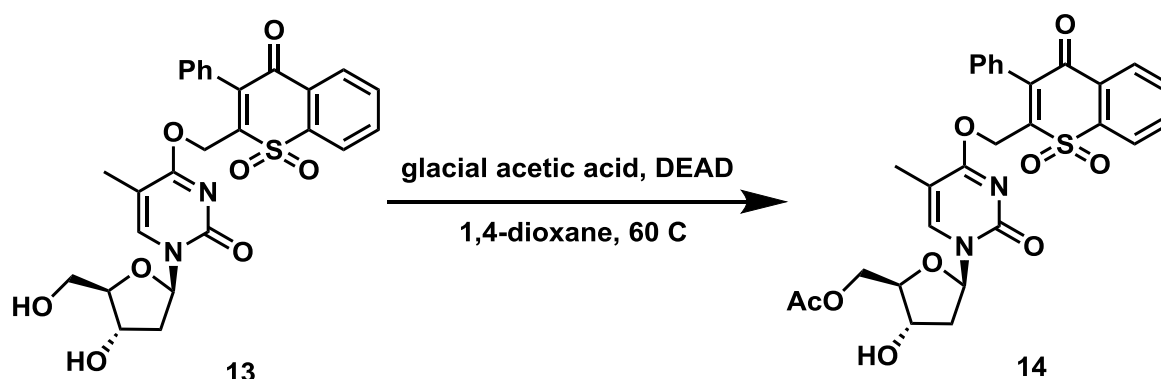
13 の合成



50 mL ナスフラスコに **12** を 100 mg (0.164 mmol) 加え、20 mL のメタノールを加え完全に溶解させた後、28%アンモニア水溶液を 3 mL 添加し、一晩攪拌させた。TLC (酢酸エチル, 検出試薬: アニスアルデヒド) で目的物を確認した後、エバポレーターで濃縮した。この際、メタノールでアンモニア水を共沸し、完全にアンモニア水を除いた。残渣を MPLC で精製し、目的化合物 **13** を黄色油状物質として収率 60% で得た。TLC : R_f = 0.26 (展開溶媒: 酢酸エチル : ヘキサン = 9 : 1), 青色に呈色. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.30 (m, 3H), 6.10 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 2.5 Hz, 2H), 4.56 (m, 1H), 3.96 (dd, *J* = 7.0, 3.0 Hz, 1H), 3.85 (ddd, *J* = 48.0,

12.0, 3.0 Hz, 2H), 2.41 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 1.88 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 178.1, 162.8, 150.5, 146.2, 141.9, 141.1, 135.4, 134.6, 133.3, 131.6, 129.3, 129.1, 128.9, 128.8, 128.6, 123.0, 110.0, 87.7, 86.9, 71.3, 62.6, 40.2, 38.8, 13.4; IR (neat) ν_{max} : 3445, 2925, 1703, 1661, 1468, 1306, 1217, 1158, 1130, 1097, 757, 700 cm^{-1} ; HRMS (ESI) Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_8\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 547.1151; Found 547.1150.

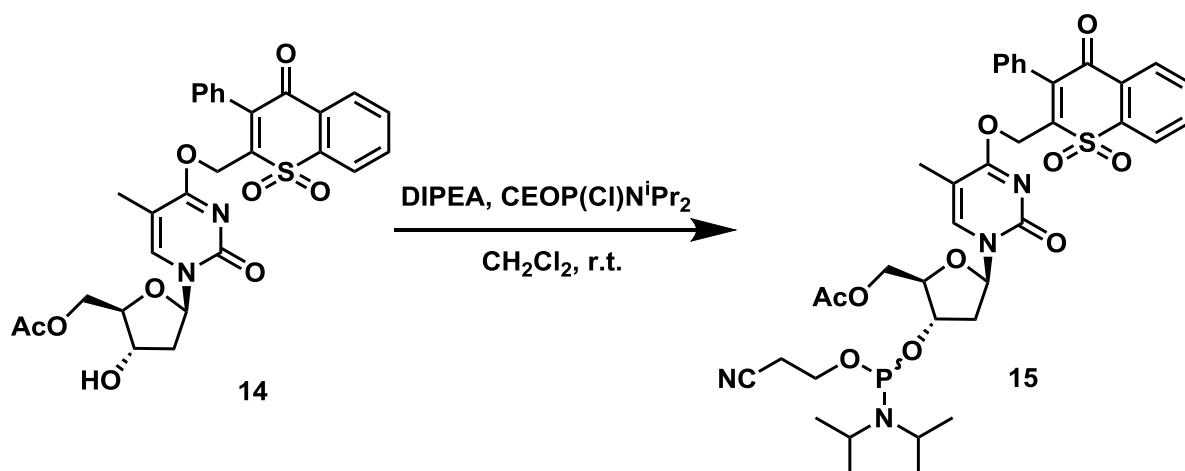
14 の合成



窒素雰囲気下、ヒートガンで乾燥した 20 mL ニロナスフラスコに **13** を 56 mg (0.107 mmol) 加え、3.2 mL の 1,4-dioxane を加えて溶解させた後、 PPh_3 を 140 mg (0.534 mmol) 加えて攪拌した。続いて、氷酢酸を 0.153 mL (2.67 mmol) 加え、60 $^\circ\text{C}$ に設定したオイルバスにて 5 分間攪拌させた後、0.149 mg (0.534 mmol) の 40% DEAD を添加し、3h 加熱攪拌させた。TLC (酢酸エチル, 検出試薬: アニスアルデヒド) で目的物を確認した後、エバポレーターで濃縮し、残渣を MPLC で精製することで、目的化合物 **14** を薄黄色固体として収率 40% で得た。

TLC : $R_f = 0.26$ (展開溶媒: 酢酸エチル : ヘキサン = 2 : 1), 青色に呈色. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.15 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.83 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.11 (m, 3H), 7.30 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 6.19 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H), 5.19 (dd, $J = 62.0, 17.0$ Hz, 2H), 4.32 (m, 3H), 4.22 (m, 1H), 4.10 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.88 (s, 3H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ : 178.1, 170.8, 162.8, 150.2, 146.2, 141.7, 141.1, 134.6, 133.6, 133.3, 131.6, 129.2, 129.0, 128.9, 128.8, 128.5, 123.0, 109.8, 86.1, 84.3, 71.3, 63.8, 40.7, 38.7, 21.0, 13.5; IR (neat) ν_{max} : 3480, 2948, 1742, 1707, 1662, 1466, 1306, 1231, 1158, 1130, 1058, 915, 759, 700 cm^{-1} ; HRMS (ESI) Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{NaO}_9\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 589.1257; Found 589.1253.

15 の合成



窒素雰囲気下、ヒートガンで乾燥した 10 mL 二口ナスフラスコに **14** を 76 mg (0.134 mmol) 加え、0.6 mL のジクロロメタンを加えて溶解させた後、DIPEA を 94 μL (0.671 mmol) 加え、室温にて 10 min 攪拌した。続いて、CEOP(Cl)NⁱPr₂ を 67 μL (0.268 mmol) 加え、室温にて 30 min 攪拌させた。TLC (酢酸エチル, 検出試薬: アニスアルデヒド) で目的物を確認した後、エバポレーターで濃縮し、残渣を MPLC で精製することで、目的化合物 **15** を薄黄色固体として収率 80% で得た。

TLC : R_f = 0.32 (展開溶媒: 酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 1), 青色に呈色. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.01 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.83 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.41 (m, 3H), 7.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.18 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 6.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 5.20 (ddd, *J* = 45.0, 16.5, 3.5 Hz, 2H), 4.45 (m, 1H), 4.34 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 4.21 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.72 (m, 1H), 3.59 (m, 2H), 2.64 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.52 (m, 1H), 2.23 (sextet, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.11 (d, *J* = 3.0 Hz, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 12H); ¹³C-NMR (CDCl₃) δ : 178.1, 170.6, 162.8, 162.7, 146.4, 141.6, 141.2, 134.6, 134.5, 133.6, 133.2, 131.6, 129.2, 129.1, 128.9, 128.8, 128.5, 123.0, 110.0, 86.2, 86.1, 72.8, 63.7, 43.5, 43.5, 43.4, 43.3, 39.8, 24.8, 24.8, 24.7, 24.7, 24.7, 24.7, 24.6, 24.6, 21.0, 20.6, 20.1, 13.4; IR (neat) ν_{max} : 2966, 2359, 1744, 1709, 1664, 1465, 1365, 1308, 1220, 1158, 1129, 1051, 977, 758 cm⁻¹; HRMS (ESI) Calcd for C₃₇H₄₃N₄NaO₁₀PS [M+Na]⁺: 789.2335; Found 789.2340.

蛍光性分子種 **A** のスペクトルデータ

白色固体, ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 8.08 (dd, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.75 (dt, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.60 (dt, *J* = 8.0, 1.0 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.33 (dt, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.20 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.11

(d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.06 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J = 8.5, 7.5$ Hz, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.55 (dd, $J = 13.5, 7.5$ Hz, 1H), 4.36 (dd, $J = 13.5, 9.0$ Hz, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.28 (s, 1H), 4.19 (dd, $J = 6.0, 4.0$ Hz, 1H), 2.13 (m, 1H), 2.11 (s, 6H), 1.87 (s, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 170.5, 170.3, 163.1, 154.7, 150.5, 147.1, 134.1, 133.1, 129.8, 127.6, 126.9, 126.2, 125.6, 123.9, 123.7, 119.1, 112.0, 111.3, 110.4, 85.9, 82.4, 74.1, 63.9, 54.7, 39.9, 37.4, 31.1, 21.1, 21.0, 13.4; IR (neat) ν_{max} : 3525, 2925, 2360, 1744, 1704, 1648, 1465, 1452, 1313, 1230, 1192, 1107, 1044, 754 cm^{-1} ; HRMS (ESI) Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_{10}\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 631.1362; Found 631.1360.

蛍光性分子種 B のスペクトルデータ

白色固体, ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 8.05 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.76 (dt, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H), 7.59 (dt, $J = 11.0, 1.5$ Hz, 1H), 7.55 (dd, $J = 6.0, 2.5$ Hz, 2H), 7.35 (dt, $J = 8.5, 1.5$ Hz, 1H), 7.24 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.14 (dd, $J = 8.0, 5.5$ Hz, 1H), 5.28 (dd, $J = 8.8, 7.8$ Hz, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.54 (dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz, 1H), 4.34 (d, $J = 4.0$ Hz, 2H), 4.32 (dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz, 1H), 4.24 (q, $J = 3.0$ Hz, 1H), 2.52 (ddd, $J = 14.3, 5.8, 1.5$ Hz, 1H), 2.14 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.84 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 170.6, 170.4, 163.1, 154.8, 150.7, 147.0, 134.0, 133.2, 133.0, 129.8, 127.4, 126.9, 126.3, 125.6, 124.0, 123.7, 119.3, 112.1, 111.4, 110.3, 86.3, 82.6, 74.3, 63.9, 54.8, 39.8, 37.9, 21.1, 21.0, 13.4; IR (neat) ν_{max} : 3628, 3019, 2930, 2360, 1743, 1706, 1649, 1465, 1452, 1313, 1231, 1140, 1107, 753 cm^{-1} ; HRMS (ESI) Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_{10}\text{S}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 631.1362; Found 631.1367.

Luc-RERF 細胞を用いた ASO の活性評価 (ルシフェリン-ルシフェラーゼ評価)

Luc-RERF 細胞の培養には、DMEM 培地 (10% FBS、1×P/S を含有) を使用した。まず、各 ASO を導入する前日に、Luc-RERF 細胞を 96well ホワイトプレートに 4000 cells/well で播種 (100 μL/well で播種) し CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C 条件で 24 時間インキュベーションする。翌日、各 ASO 水溶液をリポフェクション試薬である HiperFect (QIAGEN 社製) と混合させて室温にて 5 分間インキュベーションする。その後、終濃度が 5, 10, 20, 50 nM になるように培養液中の Luc-RERF 細胞に添加し、96well ホワイトプレートを軽く揺すって添加した ASO 濃度が well 内に均一にさせた後、CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C の条件で 24 時間インキュベーションする。24 時間後、市販のルシフェリン溶液である ONE-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega 社製) を 96well ホワイトプレート内の細胞培養液中へ 100 μL/well で加え (培養液に対して 1 : 1 の割合で加える)、室温、遮光下にて 10 分間インキュベーションした後、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

Luc-RERF 細胞を用いた ASO の活性評価 (リアルタイム定量 PCR 用の細胞ライセートの調製)

Luc-RERF 細胞の培養には、DMEM 培地 (10% FBS、1×P/S を含有) を使用した。まず、各 ASO を導入する前日に、Luc-RERF 細胞を 96well ホワイトプレートに 4000 cells/well で播種 (100 μL/well で播種) し CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C 条件で 24 時間インキュベーションする。翌日、各 ASO 水溶液をリポフェクション試薬である HiperFect (QIAGEN 社製) と混合させて室温にて 5 分間インキュベーションする。その後、終濃度が 5, 10, 20, 50 nM になるように培養液中の Luc-RERF 細胞に添加し、添加した ASO 濃度が well 内に均一になるように 96well ホワイトプレートを軽く揺すって混合させた後、CO₂ インキュベーター内にて 5% CO₂、37 °C で 24 時間インキュベーションする。24 時間後、96well ホワイトプレート内の細胞培養液を除き、well 内の細胞を洗浄するため Cell washing Buffer (CellAmp Direct RNA Prep Kit 付属) を 125 μL/well 加えて各 well を洗浄した。その後、細胞を溶解させるため、Cell Processing Buffer を 50 μL/well (CellAmp Direct RNA Prep Kit 付属の DNase I を 1 μL を含む) 加えて室温にて 5 分間インキュベーションする。その後、Cell Processing Buffer を加えた各 well について、ピペットマンで複数回ピペッティングすることで、細胞ライセート (細胞溶解液) を調製し、MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems 社製) へ全量を移す。MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate の上部を MicroAmp Optical Adhesive Film で覆ってフタをした後、PCR GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems 社製) にセットし、75 °C、5 分間インキュベーションすることで、細胞ライセート中のゲノム DNA を完全に消化する (DNase I の作用によりゲノム DNA が完全に消化される)。以上

の操作で、リアルタイム定量 PCR 用の細胞ライセートを調製する。

Luc-RERF 細胞を用いた ASO の活性評価 (リアルタイム定量 PCR 法による評価)

あらかじめ調製した各細胞ライセートを新たな MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate に 2 μ L/well で分注し、氷上に静置させておく。続いて、リアルタイム定量 PCR を実施するために One step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (タカラバイオ社製) を使用して、Master Mix 溶液を調製する。1 サンプル当りの Master Mix 溶液の内訳 (2 \times One Step SYBR RT-PCR Buffer 4: 12.5 μ L, PrimeScript PLUS RTase Mix: 0.5 μ L, Ex Taq HS: 1.5 μ L, ROX Reference DyeII: 0.5 μ L, 10 μ M Primer Mix: 1 μ L, RNase Free DW: 7 μ L, 計 23 μ L ; 尚、PrimeScript PLUS RTase は逆転写酵素の一種であり、mRNA を cDNA 化する際に機能する。さらに Ex Taq HS は DNA ポリメラーゼの一種であり、逆転写酵素により合成された cDNA を鋳型として、PCR により標的遺伝子断片を増幅する際に機能する。ROX Reference DyeII は SYBR Green I のように二本鎖 DNA に結合することによって蛍光を発する試薬として用いている)。このように調製した Master Mix 溶液を、先に分注していた 96-well Reaction Plate 中の各細胞ライセートに 23 μ L ずつ添加する (計 25 μ L/well になる)。その後、MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate の上部を MicroAmp Optical Adhesive Film で覆ってフタをした後、Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムにセットし、定量 PCR によるホタルルシフェラーゼ及びヒト RPLP0 mRNA の測定を実施する。尚、本定量 PCR におけるプログラムは、42 $^{\circ}$ C : 5 min, 95 $^{\circ}$ C : 10 sec, (95 $^{\circ}$ C : 5 sec, 60 $^{\circ}$ C : 34 sec) \times 40 cycles で実施する。また、本定量 PCR 測定で使用したホタルルシフェラーゼ cDNA 及び RPLP0 cDNA に対する各プライマーセットを以下に記載する。

ホタルルシフェラーゼ cDNA に対するプライマーセット

フォワードプライマー : 5' GCGCGGAGGAGTTGTGTTT

リバースプライマー : 5' CTGATTTTTCTTGCGTCGAGTTT

ヒト RPLP0 cDNA に対するプライマーセット

フォワードプライマー : 5' ATCAACGGGTACAAACGAGTC

リバースプライマー : 5' CAGATGGATCAGCCAAGAAGG

Luc-RERF 細胞を用いたケージド ASO の光照射脱保護評価 (ルシフェリン-ルシフェラーゼ評価)

330 nm Xenon ランプを光源に使用し、1 μ M に調製したケージド No.2_5'-2_3'-3 ASO に対して、330 nm の紫外光を 0, 60, 120 分照射し、各光照射時間におけるサン

プルの蛍光スペクトルを測定した後、各サンプルを -80°C で保存する。続いて、各 ASO を導入する前日に、Luc-RERF 細胞を 96well ホワイトプレートに 4000 cells/well で播種(100 μL /well で播種)し CO_2 インキュベーター内にて 5% CO_2 、 37°C 条件で 24 時間インキュベーションする。翌日、各 ASO 水溶液をリポフェクション試薬である HiperFect (QIAGEN 社製)と混合させて室温にて 5 分間インキュベーションする。その後、終濃度が 20 nM になるように培養液中の Luc-RERF 細胞に添加し、添加した ASO 濃度が well 内に均一になるように 96well ホワイトプレートを軽く揺すって混合させた後、 CO_2 インキュベーター内にて 5% CO_2 、 37°C の条件で 24 時間インキュベーションする。24 時間後、市販のルシフェリン溶液である ONE-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega 社製)を 96well ホワイトプレート内の細胞培養液中へ 100 μL /well で加え (培養液に対して 1:1 の割合で加える)、室温、遮光下にて 10 分間インキュベートした後、ルミノメーターにより波長 570 nm の発光を測定する。

Luc-RERF 細胞を用いたケージド ASO の光照射脱保護評価 (リアルタイム定量 PCR 用の細胞ライセートの調製)

330 nm Xenon ランプを光源に使用し、1 μM に調製したケージド **No.2_5'-2_3'-3** ASO に対して、330 nm の紫外光を 0, 60, 120 分照射し、各光照射時間におけるサンプルの蛍光スペクトルを測定した後、各サンプルを -80°C で保存する。続いて、各 ASO を導入する前日に、Luc-RERF 細胞を 96well ホワイトプレートに 4000 cells/well で播種(100 μL /well で播種)し CO_2 インキュベーター内にて 5% CO_2 、 37°C 条件で 24 時間インキュベーションする。翌日、各 ASO 水溶液をリポフェクション試薬である HiperFect (QIAGEN 社製)と混合させて室温にて 5 分間インキュベートする。その後、終濃度が 20 nM になるように培養液中の Luc-RERF 細胞に添加し、添加した ASO 濃度が well 内に均一になるように 96well ホワイトプレートを軽く揺すって混合させた後、 CO_2 インキュベーター内にて 5% CO_2 、 37°C の条件で 24 時間インキュベーションする。24 時間後、96well ホワイトプレート内の細胞培養液を除き、well 内の細胞を洗浄するため Cell washing Buffer (CellAmp Direct RNA Prep Kit 付属)を 125 μL /well 加えて各 well を洗浄した後、細胞を溶解させるため Cell Processing Buffer を 50 μL /well (CellAmp Direct RNA Prep Kit 付属の DNase I を 1 μL を含む)加えて室温にて 5 分間インキュベーションする。その後、Cell Processing Buffer を加えた各 well をピペットマンで複数回ピペッティングすることで、細胞を溶解させて細胞ライセートを調製し、MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems 社製)へ全量を移す。MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate の上部を MicroAmp Optical Adhesive Film で覆ってフタをした後、PCR GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems 社製)にセットし、 75°C 、5 分間インキュベーションすることで、細胞ライセート中のゲノム DNA を完全に消化する。以上

の操作で、リアルタイム定量 PCR 用の細胞ライセートを調製する。

Luc-RERF 細胞を用いたケージド ASO の光照射脱保護評価 (リアルタイム定量 PCR 法による評価)

Luc-RERF 細胞を用いた ASO の活性評価 (リアルタイム定量 PCR 法による評価) のプロトコールを参照 (本プロトコールと同一)。

第七節 参考文献

- 1) J. Donohue; K. N. Trueblood, *Journal of Molecular Biology*, **1960**, *2*, 363.
- 2) A. Heckel, *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **2007**, UNIT 1.17
- 3) L. Krock; A. Heckel, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, **2005**, *44*, 471.
- 4) M. J. Ellison; J. D. Childs, *Photochem. Photobiol.*, **1981**, *34*, 465.
- 5) R. Y. Walder; J. A. Walder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, *85*, 5011.
- 6) N. Dias; C. A. Stein, *Molecular Cancer Therapeutics*, **2002**, *1*, 347.
- 7) C. F. Bennett; E. E. Swayze, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **2010**, *50*, 259.
- 8) R. Kole; A. R. Krainer; S. Altman, *Nature Reviews Drug Discovery*, **2012**, *11*, 125.
- 9) J. Rautio; H. Kumpulainen; T. Heimbach; R. Oliyai; D. Oh; T. Järvinen; J. Savolainen, *Nat. Rev. Drug Discovery*, **2008**, *7*, 255.
- 10) S. Kitani; K. Sugawara; K. Tsutsumi; T. Morimoto; K. Kakiuchi, *Chem. Commun.*, **2008**, 2103.
- 11) *Handbook of Synthetic Photochemistry*; A. Albini; M. Fagnoni, Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2010**.
- 12) 杉本直己, 遺伝子化学, 化学同人, **2002**
- 13) M. Frieden; S. M. Christensen; N. D. Mikkelsen; C. Rosenbohm; C. A. Thru; M. Westergaard; H. F. Hansen; H. Orum; T. Koch, *Nucleic Acids Research*, **2003**, *31*, 6365.
- 14) 関根光雄, 多比良和誠, RNAi法とアンチセンス法, 化学同人, **2005**
- 15) M. J. Damha; P. A. Giannaris; S. V. Zabarylo, *Nucleic Acids Research*, **1990**, *18*, 3813.
- 16) J. Huggett; K. Dheda; S. Bustin; A. Zumla, *Genes and Immunity*, **2005**, *6*, 279.
- 17) F. Minner; Y. Poumay, *J. Invest. Dermatol.*, **2009**, *129*, 770.

第四章 総括

近年、光解離性保護基を生理活性分子へ導入することで、その機能を一時的に抑制したケージド化合物の開発及び応用研究に注目が集まっている。ケージド化合物をバイオロジー研究へ活用することで、従来では不可能であった生理活性分子の時空間的制御が可能になり、より詳細な生命現象の解明が可能となりつつある。現在までに、2-Nitrobenzyl (NB)系の光解離性保護基を代表とする種々の保護基が開発され、ケージド化合物へと応用されてきた経緯がある。一方、所属研究室では新規な光解離性保護基としてチオクロモン型光解離性保護基が開発されてきた。本チオクロモン型光解離性保護基の最大の特徴は、光脱保護後に副生される四環性化合物が強い蛍光を発する点にある。前述のNB基を筆頭とする従来の光解離性保護基では、光脱保護反応後に生成する保護基由来の副生物が蛍光を発するといった特性が無いことから、チオクロモン型光解離性保護基を利用することで、従来の保護基では不可能であった蛍光を指標にした光脱保護反応の追跡が可能となる。さらには、本保護基をケージド化合物へ応用することにより、副生する蛍光性化合物の蛍光を測定するだけで、バイオアッセイを実施することなく生理活性の復元をリアルタイムに追跡できる画期的な手法の開発が期待できる。しかし、これまで本保護基をケージド化合物へ適応した実績は無かった。特にケージド化合物として利用するためには、水溶液中での脱保護能が求められるものの、水溶液中での検討は皆無であった。以上の背景から、著者は本保護基を活用することで『蛍光特性を有する次世代ケージド化合物の合成と応用』に関する研究に着手した。

第一章では、光解離性保護基の概念及びその代表例に関して論じるとともに、その応用例として、近年注目が集まっているケージド化合物に関して説明した。さらに、所属研究室で研究・開発されたチオクロモン型光解離性保護基について紹介し、本保護基を利用した次世代ケージド化合物への可能性について言及した。

第二章では、*D*-ルシフェリンを題材として本保護基のケージド化合物への適応性検証を行なった。その結果、まず本保護基を導入したケージドルシフェリンの合成に成功した。また、本ケージドルシフェリンは365 nmの紫外光照射により水溶液中で脱保護が進行すること、及び脱保護後に新たに生じたルシフェリンがホタルルシフェラーゼの基質として正常に機能することを確認した。以上より、本チオクロモン型光解離性保護基がケージド化合物へ適用可能であることを実証した。一方、ケージドルシフェリンを題材とした光脱保護評価では、脱保護後に生成する四環性化合物**2**の蛍光を活用することができなかった。つまり、蛍光測定による光脱保護過程のモニタリングを達成することはできなかった。この理由は、ルシフェリン分子自体が蛍光を発する性質(ルシフェリンの蛍光スペクトルは四環性化合物**2**の蛍光スペクトルに一部重複する)を有していたことから、**2**の蛍光を正確に測定することができなかったためである。また、ホタルルシフェラーゼ安定発現細胞を用いたケージドルシフェリンの細胞内光脱保護検討では、光照射による脱保護の効果を明確に捉えることができな

った。その理由として、本ケージドルシフェリンがエステル結合を介してチオクロモン型光解離性保護基を導入していたことから、細胞内に存在している CES の作用によりエステル結合が速やかに加水分解を受けた可能性が示唆された。以上から、新たなケージド化合物を開発する際には、チオクロモン型光解離性保護基の導入先である分子自体が蛍光を発しない事、及び細胞内酵素による分解懸念の低い結合様式で本保護基を導入する必要があること、といった有益な知見を得ることができた。

第三章では、第二章で得られた知見を活用した結果、分子自体が蛍光を発する懸念の無い DNA の一種であるチミジンをターゲット分子に選択した。また、チミジンに対する本保護基の導入では、細胞内酵素による分解懸念の無いエーテル結合を介してチミジンの *O*-4 部位に導入する方法を選択した。その結果、新規ケージド核酸であるケージドチミジンの合成に成功した。また、ケージドチミジンに対する照射により、光脱保護過程の途中で蛍光性の中間体が生成することを明らかにし、その構造推定を行なった。さらに、ケージドチミジンをアンチセンスオリゴ核酸 (ASO) に導入した新規ケージド ASO への展開に取り組むことで、生体高分子への展開可能性についても検証した。さらには副生する蛍光性化合物由来の蛍光シグナルを測定するのみで生理活性復元の予測が可能か検証した。その結果、ASO の 5'末端へケージドチミジンを導入することに成功し、ホタルルシフェラーゼ mRNA に対するケージド ASO の光脱保護評価では、紫外光照射により元の ASO 活性が復元することを確認した。さらには、ケージド ASO への照射による光反応の進行及び、中間体の生成を蛍光測定によりモニターすることができ、さらに一度増加した蛍光の減少を指標に ASO 活性の復元を予想することが可能であった。この結果は、該当する生理活性評価と完全に一致するものであり、『蛍光測定のみで脱保護プロセスをモニターする』という本テーマ最大の目標を達成する結果を得ることができた。

以上、本研究によってチオクロモン型光解離性保護基がケージド化合物として利用可能であることを実証した。また、ケージド ASO の合成及び光脱保護による ASO 機能の復元を達成したことから、生体高分子への展開可能性を実証した。さらには、ケージド ASO への照射による光反応の進行及び、中間体の生成を蛍光測定によりモニターできることを実証した。このような『蛍光測定のみで脱保護プロセスのモニターが可能なケージド化合物』に関する研究は過去に例が無いため、本研究により蛍光特性を有する次世代ケージド化合物の可能性を拓いたと言える。今後、蛍光特性を活かした保護基の構造改良を行なうことで、より実用的なケージド化合物の創成が期待される。

第五章 今後の展望

本研究では、チオクロモン型光解離性保護基をケージド化合物へと利用可能か検証することに主眼を置いており、さらに本保護基の利用限界を見極めるためにも、その分子構造を変換することなく検討に利用した。第二章の検討から、細胞外においてケージド化合物として利用する分には、本保護基は十分利用可能であることが判明した。また、第三章の検討から、細胞内酵素で分解される懸念の無い、エーテル結合を介してケージド化合物を取得した場合は、光脱保護過程で蛍光を発する優れた特性を持つ一方で、光脱保護の効率が悪いことが明らかとなった。これらの検討結果から、今後本保護基を導入したケージド化合物を細胞内へ利用するためには、①光脱保護効率を向上させる、②細胞毒性の懸念の低い可視光による脱保護を可能にする、といった二つの取り組みが必要と考えられる。つまり、この二つの性能を付与するために、本保護基の改良が必要と考えられる。

過去の報告から、本保護基について①光脱保護効率を向上させるための分子設計、②より長波長に光吸収極大を付与するための分子設計に関する知見が得られている¹。この知見を参考にすると、以下のような保護基の改良案が考えられる。

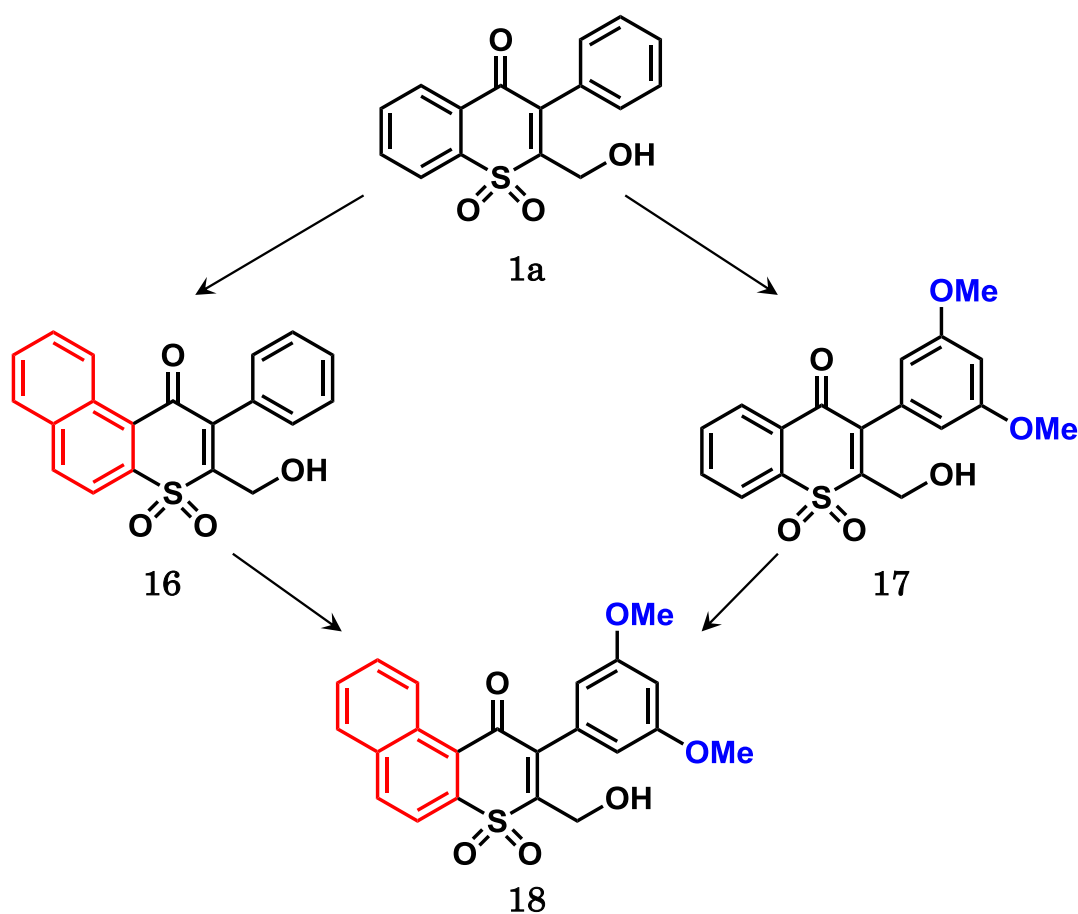


Figure 67. 保護基の改良案

Figure 67 中の保護基 **16** は、**1a** の分子内のベンゼン環を、ナフタレン環に変換した分子であり、分子内の共役がより広い範囲に広がるため、**1a** よりも長波長側に光吸収極大を有することが判明している¹。また、**1a** のフェニル基の二つのメタ位にメトキシ基を置換した保護基 **17** では、**1a** よりも光脱保護効率が向上することも判明している¹。この **16** 及び **17** のハイブリッド体である **18** に関しては過去に検討されていないが、保護基 **18** は両者の長所、つまり①**1a** よりも光脱保護効率が良く、②**1a** より長波長側の光で脱保護される、といった性質を兼ね備えた保護基になり得る可能性があると考えている。

以上のような保護基の改良を行なうことで、本チオクロモン型光解離性保護基は、『蛍光特性を有し、且つ細胞内利用に適する』という、次世代ケージド化合物に適した光解離性保護基として、さらなる価値の向上が期待される。

参考文献

1. 木谷悟, *博士論文*, 2008, 61-66.

業績一覧

【学術論文】

- (1) **Yasuo Sasaki**, Ryo Sugiura, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, “Synthesis and evaluation of new caged compound with thiochromone derivative”, *Tetrahedron*. **2014**, *70*, 7973–7976.
- (2) **Yasuo Sasaki**, Shin Hikage, Terunobu Hisai, Yasuhiro Nishiyama, Hiroki Tanimoto, Tsumoru Morimoto, Kiyomi Kakiuchi, “Synthesis and application of novel caged-DNA with fluorescent property” *in preparation*.

【国内会議】

- (1) **佐々木康雄**, ○西山靖浩, 杉浦遼, 久井輝亘, 垣内喜代三, 「チオクロモン誘導体を用いた新規ケージド化合物の合成と機能評価」(口頭発表), 講演番号: 3C-03, 光化学討論会, 愛媛大学・城北地区, 愛媛, 2013年9月11–13日
- (2) ○**佐々木康雄**, 久井輝亘, 日影薪, 西山靖浩, 垣内喜代三, 「蛍光特性を有する新規ケージド DNA の合成と評価」(口頭発表), 講演番号: 1C-17, 光化学討論会, 北海道大学 札幌キャンパス, 北海道, 2014年10月11–13日
- (3) ○NISHIYAMA, Yasuhiro; **SASAKI, Yasuo**; HISAI, Terunobu; HIKAGE, Shin; KAKIUCHI, Kiyomi; “Synthesis and Evaluation of Novel Caged Antisenseoligonucleotide possessing fluorescence property” (口頭発表), 講演番号: 2G4-16, 日本化学会 第95春季年会, 日本大学 理工学部船橋キャンパス, 千葉, 2015年3月26–29日

【国際会議】

- (1) ○Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Ryo Sugiura, Terunobu Hisai, Kiyomi Kakiuchi, “Synthesis and Evaluation of New Novel Caged Compound” (Poster session I-30), 2013 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience, Seoul National University, Seoul, Korea, Nov. 24-27, 2013

- (2) ○Yasuhiro Nishiyama, Yasuo Sasaki, Terunobu Hisai, Shin Hikage, Kiyomi Kakiuchi, “Synthesis of Novel Caged Thymidine for Caged Oligonucleotide” (Poster session P-123), 2014 The 8th Asian Photochemistry Conference, The Leela Hotel, Kovalam, India, Nov. 10-13, 2014

謝辞

本研究を行うにあたり、多くの御指導御鞭撻を賜りました垣内喜代三教授に深く御礼申し上げます。また、あらゆる面から支えていただき幾度となく議論にお付き合い頂きました西山靖浩助教に御礼申し上げます。本研究において、御助言を頂戴いたしました森本積准教授、谷本裕樹助教に深く感謝いたします。指導教員として終始変わらぬ御指導をいただき、本論文の審査をお引き受け下さいました垣内喜代三教授、廣田俊教授、山田容子教授、西山靖浩助教に心より謝意を表します。また本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を頂きました杉浦遼修士、久井輝亘修士、日影薪学士に心より感謝するとともに、日々の研究生生活において終始多大なる御協力、御支援を頂戴しました諸先輩方、同僚、後輩の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、3年間という長い学生生活を温かく見守り支えて頂いた妻、里恵に最大の感謝を申し上げます。

2015年9月

佐々木 康雄